



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07K 14/715, 19/00, C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02, G01N 33/50, C07K 16/16, 16/28, G01N 33/53, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/67290</p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月29日(29.12.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03351</p> <p>(22) 国際出願日 1999年6月23日(23.06.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/214720 1998年6月24日(24.06.98) JP 特願平10/297409 1998年10月19日(19.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)(JP/JP) 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 野村 仁(NOMURA, Hitoshi)(JP/JP) 前田正嗣(MAEDA, Masatsugu)(JP/JP) 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEINS</p> <p>(54)発明の名称 新規ヘモポエチン受容体蛋白質</p> <p>(57) Abstract Novel hemopoietin receptor proteins (proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 19 and 21); proteins having amino acid sequences derived from the amino acid sequences of the above proteins by modification via deletion, addition or substitution of one or more amino acids; genes encoding these proteins; a process for producing these proteins; and utilization of these proteins and genes.</p>		

(57)要約

新規ヘモポエチン受容体蛋白質（配列番号：1、3、5、7、19、または21に示すアミノ酸配列を有する蛋白質）、該蛋白質中のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、及び／もしくは他のアミノ酸による置換により修正されたアミノ酸配列を有する蛋白質、これら蛋白質をコードする遺伝子、該蛋白質の製造方法、並びにこれら蛋白質及び遺伝子の用途を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	CW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

### 新規ヘモポエチン受容体蛋白質

#### 技術分野

本発明は新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードする遺伝子、それらの製造方法及び用途に関する。

#### 背景技術

種々の細胞の増殖分化、あるいは分化成熟した細胞の機能の賦活化さらには細胞死に関与する体液性因子として数多くのサイトカインの存在が知られている。これらのサイトカインにはそれぞれ特異的な受容体が存在し、これらの受容体は構造上の類似性から幾つかのファミリーに分類されている(Hilton D.J., in "Guidebook to Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola N.A. (A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press), 1994, p8-16)。

一方、受容体間の類似性と比較するとサイトカイン同士の一次構造上の相同性は低く、同一の受容体ファミリーに属するサイトカインメンバーの間でさえアミノ酸レベルでの顕著な相同性は認められない。このことは個々のサイトカインの機能の特異性を説明すると同時に、個々のサイトカインにより誘導される細胞の反応の類似性を説明する。

上記サイトカイン受容体ファミリーの代表的なものとして、チロシンキナーゼ受容体、ヘモポエチン受容体、腫瘍壊死因子(TNF)受容体、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF $\beta$ )受容体の各ファミリーが挙げられ、それぞれのファミリーで異なるシグナル伝達系の関与が報告されている。これらの受容体ファミリーのうち、特にヘモポエチン受容体ファミリーの多くは血液細胞あるいは免疫

担当細胞に発現しており、そのリガンドであるサイトカインはしばしば造血因子あるいはインターロイキンと称される。これら造血因子、あるいはインターロイキン類のあるものは血流中に存在し全身的な造血あるいは免疫機能の体液性調節に関与していると考えられる。

このことは他のファミリーに対応するサイトカインがしばしば局所での調節にのみ関与していると考えられる点とは対照的で、これらヘモポエチン類の一部のものはホルモン様因子と捉えることが可能であり、また逆に代表的なペプチド性ホルモンである成長ホルモン、プロラクチンあるいはレプチンの受容体もヘモポエチン受容体ファミリーに属する。上記ホルモン様の全身性調節様式からこれらのヘモポエチン類を投与することによる種々の疾患の治療への応用が期待される。

事実、数多いサイトカイン類の中で臨床応用が行われているのは、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、IL-2であり、また現在臨床応用に向けた検討が行われている、IL-11、LIF、IL-12に加えて上記ペプチドホルモン類の成長ホルモン、プロラクチンを併せて考えると、上記各種受容体ファミリーのうちヘモポエチン受容体に結合する新規サイトカインを探索することにより、より高い確率で臨床応用可能なサイトカインを見出すことが可能と考えられる。

上に述べた様にサイトカイン受容体はファミリーメンバー間で構造上の類似性を有している。この類似性を利用して新規受容体を発見する試みは数多く行われており、特にチロシンキナーゼ受容体に関しては、その触媒部位の高度に保存された配列を利用して既に数多くの受容体がクローニングされている (Matthews W. et al., Cell, 1991, 65 (7) p1143-52)。これに対してヘモポエチン受容体はその細胞質領域にチロシンキナーゼの様な酵素活性ドメインを有しておらず、そのシグナル伝達は細胞質中に遊離状態で存在する別のチロシンキナーゼ蛋白との会合を介して行われることが知られている。

これらの細胞質性チロシンキナーゼ (JAKキナーゼ) との受容体上の結合部位

はファミリーメンバー間で一応保存されてはいるものの、その相同性はあまり高くない (Murakami M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1991, 88, 11349-11353)。一方、これらヘモポエチン受容体を最もよく特徴付ける配列はむしろ細胞外領域に存在し、特にTrp-Ser-Xaa-Trp-Ser (Xaaは任意のアミノ酸) の5アミノ酸から成るモチーフは殆ど全てのヘモポエチン受容体に保存されており、この配列を利用した新規ファミリーメンバーの探索により新規受容体を取得することが期待される。事実、これまでにIL-11受容体 (Robb, L. et al., J. Biol. Chem. 271 (23), 1996, 13754-13761)、レプチン受容体 (Gainsford T. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1996, 93 (25) p14564-8) 及びIL-13受容体 (Hilton.D.J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1996, 93 (1) p497-501) がこのアプローチにより同定されている。

#### 発明の開示

本発明は、新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードするDNAを提供する。本発明はまた、該DNAが挿入されたベクター、該DNAを保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法を提供する。本発明はさらに、該蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明者らは、これまでに、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフをコードするオリゴヌクレオチドをプローブに用いてブランクハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR等の方法により新規受容体の探索を試行してきた。しかし、このモチーフをコードするオリゴヌクレオチドtgag(t/c)nnntgag(t/c)(nは任意の塩基)が15塩基対と短いこと、さらにはg/c含量が高い等の理由から通常のハイブリダイゼーションの実験条件下で厳密に15塩基が完全にハイブリダイズしたものだけを選別することは極めて困難であった。

また、比較的広範に分布しかつ発現量も高いと考えられる各種コラーゲンを初めとするヘモポエチン受容体以外の蛋白をコードするcDNA中にも類似の

配列が含まれており、これらの原因により上記ブランクハイブリダイゼーションあるいはRT-PCRによるスクリーニングは極めて効率の悪いものであった。

これらの問題を解決するべく、また実際ヒトゲノム上に幾つの異なるヘモポエチン受容体遺伝子が存在するのかを推定する目的で、上記Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフをコードする全ての可能なオリゴヌクレオチド配列をプローブとしてコンピュータ上で個々のプローブと完全に一致する配列の検索を実施した。

次に、上記検索でヒットしたクローンのうちヒトゲノム由来クローン（コスミド、BAC、PAC）について、プローブ配列周辺の塩基配列をアミノ酸配列に変換して既知のヘモポエチン受容体のアミノ酸配列と比較することにより、ヘモポエチン受容体ファミリーメンバーをコードすると考えられるヒト遺伝子を選別した。

以上の検索により2つのヘモポエチン受容体遺伝子と考えられるクローンを同定した。このうち1つは既知のGM-CSFベータ受容体遺伝子（第22染色体22q12.3-13.2領域由来）であり、もう1つ（第16染色体16p12領域由来BACクローンAC002303）は新規ヘモポエチン受容体をコードすると推測され、このヒト遺伝子を「NR8」と命名した。

次に、得られた塩基配列をもとにしてデザインされた特異的なプライマーを利用したRT-PCRによりNR8をコードすると考えられるcDNAをヒト胎児肝細胞cDNAライブラリー中に見いだした。さらに、このcDNAライブラリーを鋳型に5'-RACE法、3'-RACE法を行うことにより最終的に361アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体をコードする完全長cDNA、NR8 $\alpha$ を得た。

NR8 $\alpha$ は一次構造上、細胞外領域に他のファミリーメンバー間で保存されているシスチイン残基、プロリンに富んだモチーフ、細胞内領域にシグナル伝達に関与すると考えられるbox1モチーフ等がよく保存されており典型的なヘモポエチン受容体と考えられた。

さらに、本発明者らは、NR8 $\alpha$ の選択的スプライシング産物として、それぞれ

NR8 $\beta$ 、NR8 $\gamma$ と命名された2つの遺伝子の存在を見出した。

本発明者等は、次に、NR8 遺伝子に対応するマウス遺伝子の単離を試みた。まず、ヒト NR8 の cDNA 配列内に設計した、オリゴヌクレオチドプライマーを利用し、異種間交叉 PCR クローニングをマウス脳 cDNA ライブラリーを鋳型として実施することにより、当該受容体のマウス部分塩基配列を単離した。さらに得られた部分配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、それらを用いた 5'-RACE 法、及び 3'-RACE 法を実施することで、NR8 に対応するマウス相同遺伝子の全長 ORF の単離に成功した。得られた cDNA クローンの全塩基配列を決定した結果、NR8 同様にスプライス変異体に由来する転写産物の相違により、538 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体蛋白をコードするマウス NR8 $\gamma$ と、144 アミノ酸からなる分泌型の可溶性受容体様蛋白をコードするマウス NR8 $\beta$ の存在が確認された。当該受容体遺伝子がコードするアミノ酸配列をヒトとマウス間において比較したところ、NR8 $\gamma$ では 98.9% の高い相同性が認められ、一方 NR8 $\beta$ においても 97.2%の相同性を認めた。さらに、得られたマウス NR8 $\beta$  cDNA 断片をプローブとして、マウスゲノム DNA ライブラリーに対するブラックスクリーニングを実施することで、目的の陽性クローンを単離することに成功した。

従って、本発明は、(1) 配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(2) 配列番号：3に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他の

アミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：3に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(3)配列番号：5に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：5に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(4)配列番号：7に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：7に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(5)配列番号：19に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：19に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(6)配列番号：21に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：21に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配



列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(7) 配列番号：2 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：1 に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(8) 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：3 に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(9) 配列番号：6 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：5 に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(10) 配列番号：8 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：7 に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(11) 配列番号：20 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：19 に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(12) 配列番号：22 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：21 に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

本発明はまた、(13) 上記(1)～(12)のいずれか1つに記載の蛋白

質と他のペプチド又はポリペプチドとからなる融合蛋白質を提供する。

本発明はまた、(14) 上記(1)～(13)のいずれか1つに記載の蛋白質をコードするDNAを提供する。

本発明はまた、(15) 上記(14)に記載のDNAが挿入されたベクターを提供する。

本発明はまた、(16) 上記(14)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体を提供する。

本発明はまた、(17) 上記(16)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、上記(1)～(13)のいずれか1つに記載の蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、(18) 上記(1)～(13)に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 上記(1)～(13)のいずれか1つに記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

(b) 上記(1)～(13)のいずれか1つに記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法を提供する。

本発明はまた、(19) 上記(1)～(12)のいずれか1つに記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体を提供する。

本発明はまた、(20) 上記(19)に記載の抗体と、上記(1)～(13)のいずれか1つに記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、前記抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる該蛋白質の検出又は測定方法を提供する。

本発明はまた、(21) 配列番号：2、4、6、8、20、および22から27のいずれか一つに記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAを提供する。

本発明は、新規ヘモポエチン受容体「NR8」に関する。本発明者らによる、5

5'-RACE及び3'-RACEによる解析、NR8ゲノム配列の解析、さらにはブラークスクリーニングによる解析の結果から、NR8 $\alpha$ 、NR8 $\beta$ 、NR8 $\gamma$ の存在が予測された。これらNR8遺伝子の構造を図13に示す。NR8遺伝子のうち、NR8 $\beta$ は第5エクソンを欠いたオルタナティブスプライス産物であり、第4エクソンに直結しフレームシフトを起こして生じた第6エクソン上の終止コドンでCDSが終結する可溶性蛋白質と第4エクソン上のATGから開始するシグナル配列を欠いた膜結合蛋白質の2種の異なる蛋白をコードすることが可能である。

このうち可溶性蛋白はNR8 $\alpha$ と第4エクソンまでは同じアミノ酸配列をとることから可溶性受容体として機能する可能性がある。一方、NR8 $\gamma$ はやはり選択的スプライシングの結果、NR8 $\alpha$ のC末端近傍にNR8第9イントロンに由来する177アミノ酸の挿入を含む蛋白質をコードする。

NR8 $\alpha$ とNR8 $\gamma$ はともに細胞膜貫通型のヘモポエチン受容体をコードする。NR8 $\alpha$ 及びNR8 $\gamma$ の細胞内ドメインにはシグナル伝達に関与すると考えられる他のヘモポエチン受容体間で保存されている配列のうちBox1に似たモチーフが細胞膜近傍に存在する。Box2についても保存度は低いながら類似の配列が存在することから、NR8はホモ2量体でシグナルを伝達するタイプの受容体に属するものと考えられる。

本発明の蛋白質に含まれるNR8と命名された蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1（NR8 $\alpha$ ）、配列番号：3（可溶型NR8 $\beta$ ）、配列番号：5（膜結合型NR8 $\beta$ ）及び配列番号：7（NR8 $\gamma$ ）に示し、該蛋白質をコードするcDNAの塩基配列を配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6及び配列番号：8に示す。

また、ノーザン解析の結果、脾臓、胸腺、末梢白血球、肺において、5kbと3-4kbの領域に2-3本のバンドを認めた。細胞株についても同様なサイズのバンドをHL60とRajiに認め、他の癌細胞株（HeLa、SW480、A549、G361）及び白血病細胞株（K562、MOLT4）には全く発現を認めなかった。

以上の結果はNR8が造血細胞系、特に顆粒球系とB細胞系に特異的に発現して

いることを示唆する。

上記NR8蛋白質には、医療への応用が考えられる。NR8が胎児肝、脾臓、胸腺及びある種の白血病細胞株に発現していることから未知の造血因子の受容体である可能性が示唆される。従って、NR8蛋白はこの未知の造血因子を得るための有用な材料を提供するものと考えられる。

また、NR8の発現はこれら造血組織中の限られた細胞集団に特異的に発現している可能性が想定され、この細胞集団を分離する手段として抗NR8抗体は有用である。この様にして分離された細胞集団は細胞移植療法への応用が可能である。さらに抗NR8抗体は白血病を初めとした疾患の病型診断あるいは治療への応用も期待される。

一方、NR8蛋白質の細胞外ドメインを含む可溶性蛋白質、あるいはNR8のスプライス変異体であるNR8 $\beta$ はdecoy型受容体としてNR8リガンドの阻害剤としての利用が想定され、NR8が関与する白血病を初めとする疾患の治療への応用が期待できる。

また、本発明者等は、異種間交叉PCR クローニングの手法を利用して、上記ヒト由来のNR8 cDNAに対応するマウスNR8 cDNAを単離した。本発明の蛋白質に含まれるマウスNR8と命名された蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：19（可溶性マウスNR8 $\beta$ ）と配列番号：21（マウスNR8 $\gamma$ ）に示し、該蛋白質をコードするcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：20と配列番号：22に示す。

得られたマウス cDNA クローンの構造解析の結果、ヒト由来のNR8 同様にスプライス変異体に由来する転写産物の相違により、538 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体蛋白をコードするマウス NR8 $\gamma$ と、144 アミノ酸からなる分泌型の可溶性受容体様蛋白をコードするマウス NR8 $\beta$ の存在が確認された。当該受容体遺伝子がコードするアミノ酸配列をヒトとマウス間において比較したところ、NR8 $\gamma$ では 98.9% の高い相同性が認められ、一方 NR8 $\beta$ においても 97.2%の相同性を認めた。

ノーザン解析および RT-PCR 解析により、マウス NR8 遺伝子は、発現量に偏差はあったものの、解析した全ての臓器で発現が認められるなど、免疫担当組織や造血組織においてのみ強い発現が認められたヒト由来の NR8 に対し、その遺伝子発現は広範な存在分布を示した。これは、マウスにおける NR8 の分子機能が、多岐にわたる生体の生理調節機構に関与する可能性をも示唆している。

本発明はまた、上記ヒトおよびマウス NR8 蛋白質と機能的に同等な蛋白質も包含する。本発明において「機能的に同等」とは、蛋白質が、上記 NR8 蛋白質と同等の生物学的活性を有することを指す。生物学的活性としては、例えば、造血因子受容体蛋白質活性である。このような蛋白質を得るための方法としては、蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入する方法が用いられている。例えば、合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法により、蛋白質中のアミノ酸配列に所望の変異を導入することができる (Kramer, W. and Fritz, H. J. Methods in Enzymol. (1987) 154, 350-367)。また、PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL 製) を使用して、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入することもできる。これらの方法により、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：19、または配列番号：21 に示されたアミノ酸配列からなる蛋白質において、その生物学的活性に影響を与えないよう、1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾された、NR8 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることができる。

本発明の NR8 蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：19、および配列番号：21 のいずれかに示されるアミノ酸配列中の 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以上 30 個以下、より好ましくは 2 個以上 10 個以下のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5 及び配列番号：7 のいずれかに示されるアミノ酸配列に 1 又は 2 個以上、好ましくは、2 個以

上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5及び配列番号：7のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

例えば、本発明のNR8蛋白質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質として、融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、本発明のNR8蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に包含される。融合蛋白質を作製する方法は、本発明のNR8蛋白質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また蛋白質としては、例えばGST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA

(インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードするDNAを融合させたものを用いることができる。

本発明の蛋白質はまた、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：20および配列番号：22から27のいずれかに示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされており、且つ上記NR8蛋白質と機能的に同等な蛋白質を含む。ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42°C、2×SSC、0.1% SDSが挙げられ、好ましくは50°C、2×SSC、0.1% SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65°C、2×SSC及び0.1% SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

また、本発明には上記NR8蛋白質と機能的に同等であり、且つ配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：19および配列番号：21のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する蛋白質と相同性を有する蛋白質も含まれる。相同性を有する蛋白質とは、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5及び配列番号：7のいずれかに示されるアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%以上、アミノ酸配列上の相同性を有する蛋白質を意味する。蛋白質の相同性を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明の蛋白質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態が異なっている。

しかしながら、得られた蛋白質が造血因子受容体蛋白質活性を有している限り、本発明に含まれる。

例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。また、真核細胞、例えば哺乳動物細胞で発現させた場合、N末端のシグナル配列は除去される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。

例えば、文献 (Von Heijne, G. *Nucleic Acids Research* (1986) 14, 4683-4690) に記載の方法に基づいて、本発明の蛋白質を解析した結果、シグナル配列は配列番号：1のアミノ酸配列において、1位のMetから19位のGlyまでと推定された。したがって、本発明は配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、20位のCysから361位のSerまでからなる蛋白質を包含する。

本発明の蛋白質を製造するには、得られたDNAを発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、蛋白質を発現させる。

具体的には次のようにすればよい。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明の蛋白質をコードするDNA、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターを構築する。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ )の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。



例えば、SV 40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

複製開始点としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバビローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明の蛋白質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウィルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、pAdexLcw、レトロウィルス由来の発現ベクター、例えばpZIpneo、酵母由来の発現ベクター、例え

ばpNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2が挙げられる。

本発明のベクターには、in vivo、in vitroで本発明の蛋白質を製造するのみならず、哺乳動物、例えばヒトの遺伝子治療に用いるものも含まれる。

上述のように構築された本発明の発現ベクターの宿主への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系としては、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞として

は、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40°Cで約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とするDNAをやぎ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をやぎの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985))。

315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、タバコの葉より所望のポリペプチドを得る (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

上記で得られた本発明の蛋白質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプ

チダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

本発明はまた、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：19、及び配列番号：21のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の活性中心からなる部分ペプチドを含む。本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質の分子のうち、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の1つあるいは複数の領域を含む部分ペプチドが挙げられる。これらの部分ペプチドは1つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。例えば、本発明の蛋白質の可溶型蛋白質や細胞外領域からなる蛋白質も本発明に包含される。

本発明の蛋白質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードするDNAに関する。本発明の蛋白質をコードするcDNAは、例えば、本明細書に記載のプロープを用いヒトcDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができる。

得られたcDNA又はcDNA断片をプロープとして、さらにcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより異なる細胞、組織、臓器又は種からcDNAを得ることができる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。

また、得られた cDNA をプローブとしてジェノミック DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ジェノミック DNA を単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。また、本発明のDNAを市販のキ

ットや公知の方法によって改変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン（ATG）及び／又は終始コドン（ATT、TGA又はTAG）の挿入等が挙げられる。

本発明のDNAは、具体的には配列番号：2の塩基配列において441位の塩基Aから1523位の塩基CからなるDNA、配列番号：4の塩基配列において441位のAから872位の塩基AからなるDNA、配列番号：6の塩基配列において659位の塩基Aから1368位の塩基CからなるDNA及び配列番号：8の塩基配列において441位の塩基Aから2054位の塩基CからなるDNA、配列番号：20の塩基配列において439位の塩基Aから870位の塩基AからなるDNA、及び配列番号：22の塩基配列において439位の塩基Aから2052位の塩基CからなるDNAを包含する。

本発明のDNAはまた、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：20、及び配列番号：22から27のいずれかに示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記NR8蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを含む。

ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42°C、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50°C、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65°C、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは天然由来のDNA、例えばcDNA又は染色体DNAである。

実施例に示すごとく、本発明の蛋白質をコードするcDNAとハイブリダイズする遺伝子のmRNAは、ヒトの種々の組織にも分布していることが判明し

た。従って、上記の天然由来のDNAは、例えば実施例において本発明の蛋白質をコードするcDNAとハイブリダイズするmRNAが検出される組織由来のcDNAやジェノミックDNAであってもよい。また、本発明の蛋白質をコードするDNAは、cDNAやジェノミックDNAの他、合成DNAであってもよい。

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物をスクリーニングする方法としては、当業者に通常用いられる多くの方法を使用することができる。本発明のスクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物としては、結合活性を有する蛋白質であってもよく、あるいは結合活性を有する化学合成された化合物であってもよい。

また、本発明のスクリーニング方法で使用される被験試料としては、例えばペプチド、精製若しくは粗精製蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液が挙げられる。これらの被験試料は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニングは、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法(Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90)を用いて行うことができる。本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していると予想される細胞、組織、臓器よりcDNAを単離し、これをファージベクター、例えばλgt11、ZAPII等へ導入してcDNAライブラリーを作製し、これを



培地を引いたプレート上で発現させ、フィルターに発現させた蛋白質を固定し、標識して精製した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明の蛋白質と特異的に結合するリガンドのスクリーニングは、本発明の蛋白質の細胞外ドメインと既知のシグナル伝達能を有するヘモポエチン受容体蛋白質の細胞膜貫通ドメインを含む細胞内ドメインとを連結せしめて作製したキメラ受容体を、適当な細胞株、好ましくは適当な増殖因子の存在下でのみ生存および増殖可能な細胞株（増殖因子依存性細胞株）の細胞表面に発現せしめた後、該細胞株を種々の増殖因子、サイトカイン、または造血因子等を含むことが期待される材料を添加して培養することにより実施可能である。この方法は、被検材料中に本発明蛋白質の細胞外ドメインと特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ、上記増殖因子依存性細胞株が生存および増殖が可能であることを利用している。既知のヘモポエチン受容体としては、例えば、トロンボポエチン受容体、エリスロポエチン受容体、G-CSF受容体、gp130等が挙げられるが、本発明のスクリーニング系に用いるキメラ受容体のパートナーは、これら既知のヘモポエチン受容体に限定されるものではなく、細胞質ドメインにシグナル伝達活性に必要な構造を備えているものであれば何を用いても構わない。増殖因子依存性細胞株としては、例えば、BaF3やFDC-P1を初めとしたIL3依存性細胞株を利用することが可能である。

本発明の蛋白質と特異的に結合するリガンドとしては、希ではあるが可溶性蛋白質ではなく細胞膜結合型蛋白質である可能性も想定される。このような場合にはむしろ本発明の蛋白質の細胞外ドメインのみを含む蛋白質あるいは当該細

胞外ドメインに他の可溶性蛋白質の部分配列を付加した融合蛋白質を標識後、リガンドを発現していることが期待される細胞との結合を測定することによりスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質の細胞外ドメインのみを含む蛋白質としては、例えば、細胞膜貫通ドメインのN端側に終止コドン挿入することにより人為的に作成した可溶性受容体蛋白質、あるいはNR8 $\beta$ の可溶性蛋白質が利用可能である。一方、本発明の蛋白質の細胞外ドメインに他の可溶性蛋白質の部分配列を付加した融合蛋白質としては、例えば、免疫グロブリンのFc部位やFLAGペプチド等を細胞外ドメインのC端に付加して調製した蛋白質が利用可能である。これらの可溶性標識蛋白質は上述したウエストウエスタン法における検出にも利用可能である。

本発明の蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングは、two-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行うこともできる。

two-ハイブリッドシステムにおいては、本発明の蛋白質とヘテロダイマーからなる転写調節因子の一方のサブユニットとの融合蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクター及び被験試料として所望のcDNAとヘテロダイマーからなる転写調節因子のもう一方のサブユニットをコードするDNAを連結してなるDNAを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させる。本発明の蛋白質にcDNAがコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現する。従って、本発明の蛋白質に結合する蛋白質を、レポーター遺伝子の発現量を検出又は測定することにより選択することができる。

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNAとLexAのDNA結合ドメインをコードする遺伝子とをフレームが一致するように連結し、発現ベクターを作製する。次に、所望のcDNAとGAL4転写活性化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクタ

一を作製する。

LexA結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節されるHIS3遺伝子を組み込んだ細胞を上記のtwo-ハイブリッドシステム発現プラスミドを用いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートするとタンパクの相互作用が認められたときのみ細胞の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができる。

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子の他、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子、ADE2遺伝子、LacZ遺伝子、CDC25H遺伝子等を用いることができる。

two-hybrid systemは、通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販のtwo-ハイブリッドシステムのキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれもCLONTECH製)、HybriZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene製)、CytoTrap two-hybrid system (Stratagene製) が挙げられる。

本発明の蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。すなわち、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被験試料を適用する。この場合の被験試料としては、細胞の培養上清、細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被験試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合した蛋白質を得ることができる。

本発明のスクリーニング方法によって単離される化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進又は阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される化合物も、本発明のス

クリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物をヒトや他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコ

ール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明の抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

本発明の蛋白質に対して特異的に結合する抗体は、蛋白質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、本発明の蛋白質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来

の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、本明細書に記載された全ての蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を使用できる。また、蛋白質の部分ペプチドも用いることができる。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質のアミノ基（N）末端断片やカルボキシ（C）末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に特異的に反応する抗体を意味する。

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得、この蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界サル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与

し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついて、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウィルスに感染したヒトリンパ球をin vitroで蛋白質、

蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688）。

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.



S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerr a, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR(相補性決定領域)とヒト抗体由来のFR(フレームワーク領域)及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗

浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、前記抗体と蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することから成る本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：20及び配列番号：22から27のいずれか一つに示される塩基配列からなるDNAまたは該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAを包含する。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと選択的にハイブリダイズし得るプローブ、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が含まれる。

本発明は、例えば、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：20及び配列番号：22から27のいずれか一つに示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：20及び配列番号：22から27のいずれか一つに示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

選択的に安定にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明の蛋白質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、バップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg好ましくは0.1~50mg/kgの範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、したがって本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、AC002303配列中に唯一存在するプローブ配列40952-40966を含む40952-40966の180塩基を質問式(query)としたBlastX検索による結果を示す模式図である。「#」:NR8についてのみ番号はヌクレオチド数にて表示した。NR8配列に付したアンダーラインはエクソンに相当する部分を示す。他のアンダーラインで示した配列は、同一アミノ酸を示す。

図2は、AC002303配列中に唯一存在するプローブ配列40952-40966を含む40952-40966の180塩基を中心に5'、3'両方向に180塩基ずつBlastXスキャンした結果を示す模式図である。

図3は、ヒト胎児肝、骨格筋 cDNA を鋳型として SN1/AS1、SN1/AS2、SN2/AS1、SN2/AS2 のプライマーの組み合わせで RT-PCT 法にて増幅した結果を電気泳動した時の図を示す。

図4は、ヒト胎児肝 cDNA を鋳型として 5'-RACE 法、3'-RACE 法を実施した結果を電気泳動した時の図を示す。

図5は、NR8 $\alpha$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。RT-PCR に用いたプライマーの位置を矢印で示した。5' 側から順に、SN1(798-827)、SN2(894-923)、AS2(1055-1026)、AS1(1127-1098) である。但し AS1 については 5' 端の2塩基は CT ではなく、ゲノム由来の AC を用いた。

図6は、NR8 $\alpha$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列の図5の続きを示す図である。

図7は、NR8 $\beta$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。二つの可能なオープンリーディングフレーム (ORF) を示した。

図8は、NR8 $\beta$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図7の続きの図である。

図9は、NR8 $\gamma$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。選択的スプライシングにより挿入される177アミノ酸を下線で示した。

図10は、NR8 $\gamma$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図9の続きの図である。選択的スプライシングにより挿入される177アミノ酸に下線を施した。

図11は、NR8 $\gamma$  の cDNA の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図10の続きの図である。

図12は、NR8 の各臓器における発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示す図である。

図13は、NR8 遺伝子の構造を模式的に示す図である。他の繰り返しには、(CA) $_n$ , (CAGA) $_n$ , (TGGA) $_n$ , (CATA) $_n$ , (TA) $_n$ , (GA) $_n$ , (GGAA) $_n$ , (CATG) $_n$ , (GAAA) $_n$ , MSTA, AT-rich, MLT1A1, LINE2, FLAM\_C, MER63A, MSTB を含む。

図14は、発現ベクターにおいて構築した発現可能な蛋白質の構造模式図を示す。

図15は、ヒトNR8プライマーセットをマウスcDNAライブラリーに対して用いた、交叉PCRの結果を示す。サイズマーカーとして100 bp DNA Ladder (NEB #323-1L)を用いた。

図16は、ヒト及びマウスNR8 $\beta$ のアミノ酸配列を比較した結果を示す。両者が一致するアミノ酸配列に色塗りを施した。また配列中、他のヘモポエチン受容体に保存されたシステイン残基を太字で記した。

図17は、ヒト及びマウスNR8 $\gamma$ のアミノ酸配列を比較した結果を示す。両者が一致するアミノ酸配列に色塗りを施した。また配列中、他のヘモポエチン受容体に保存されたシステイン残基、及びWSXWS-Boxを太字で記した。

図18は、RT-PCR法によって各マウス臓器におけるNR8遺伝子の発現様態を解析した結果を示す。サイズマーカーとして100 bp DNA Ladder (NEB#323-1L)を用い、レーンの両端に示した。何れの臓器においても320 bpの標的遺伝子が検出されている。

図19は、ノーザンブロッティング法によって、各マウス臓器におけるNR8遺伝子の発現様態を解析した結果を示す(左)。精巣においてのみ、約4.2 kbの転写産物が強く検出された。陽性対照として同一プロットのマウスベータアクチンの検出も実施した(右)。

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

##### [実施例1] 2段階Blast検索

Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフをコードするオリゴヌクレオチドとしてtggag (t/c)nnntggag(t/c) (nは任意の塩基) からなる256通りのプローブ配列をデザ

インした。この配列によりEP0受容体、TP0受容体及びマウスIL6受容体を除く殆ど全ての既知ヘモポエチン受容体が検出可能である。個々の配列を質問式 (query) としてGenBankのnrデータベースをBlastN(Advanced BlastN 2.0.4)プログラムを用いて検索した。検索のパラメータは期待値を100とした以外はdefault値 (Descriptions=100、Alignments=100) を用いた。

この一次検索の結果、約500個のプローブ配列と完全にマッチするクローンが得られたので、このうちヒトゲノム由来クローン (コスミド、BAC及びPAC) について、プローブ配列をほぼ中央に含む180塩基の配列を切り出した。次にこの180塩基からなる配列を質問式 (query) としてBlastX (Advanced BlastX 2.0.4) プログラムを用いて再度nrデータベースを検索することにより、プローブ配列周辺のアミノ酸配列の既知ヘモポエチン受容体との相同性を検索した。

検索のパラメータは、通常、期待値を100とした以外はdefault値を用いたが、しばしば極めて多数のヒット (高度反復配列であるAluサブファミリーに起因) が得られた場合に既知ヘモポエチン受容体へのヒットを覬測することが困難であったことから、このような場合は感度を最大限とするため、「Expect=1000、Descriptions=500、Alignments=500」の値を用いた。

BlastXによる2次検索の結果、28のクローンが1個以上の既知ヘモポエチン受容体をヒットした (表1から表8)。

表 1

プローブ	Xaa	アミノ酸番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGTAATTGGAGC	Asn	AL009181	30692 tggagtaattggagc 30678	1p34.1-1p35	mLL11R(opposite), FOBR
TGGAGCTGATGGAGC	***	Z97987	140006 tggagctgatggagc 139992	1p36.2-36.3	line1, Leu Zip p40,
TGGAGCAGCTGGAGC	Ser	AF023268	39931 tggagcagctggagc 39917	1q21	metaxin
TGGAGCTGCTGGAGC	Cys	AL009051	78023 tggagctgctggagc 78037	1q23-24	HP-10, semaphorin F,G
TGGAGCACGTGGAGT	Thr	Z97200	112905 tggagcacgtggagt 112891	1q24	AFP enhancer BP, RAR
TGGAGTGCCTGGAGC	Ala	U95626	101031 tggagtgcctggagc 101017	3	CFTC, TcR
TGGAGTAGATGGAGT	Arg	Z84495	2547 tggagtagatggagt 2533	3p21.3	trithorax
TGGAGCTGATGGAGT	***	Z74023	5255 tggagctgatggagt 5241	3p21.3	E2ABP, fibronectin, nidgen
TGGAGTTCTGGAGT	Phe	Z68275	7291 tggagttctggagt 7277	4p16.3	mena, NMDAR
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	Z54072	21277 tggagtcctggagt 21291	4p16.3	crk, AchR, HER3
TGGAGCTGCTGGAGC	Cys	Z69837	30266 tggagctgctggagc 30252	4p16.3	KIT, FLT3, PDGFRa
TGGAGTTACTGGAGT	Tyr	AC003951	27290 tggagttactggagt 27304	5	collagen
TGGAGCCTGTGGAGT	Leu	AC004502	48334 tggagcctgaggagt 48320	5	ADAMTS-1, properdin, etc
TGGAGTTGATGGAGC	***	L81613	2418 tggagttgatggagc 2404	5	APC, bat2, p53
TGGAGTGATGGAGT	Val	AC002122	43679 tggagtgatggagt 43665	5p15.2	Met tRNA synthase
TGGAGTCCATGGAGT	Pro	AC002380	34646 tggagtcctatggagt 34632	5p15.2	N-WASP, enigma
TGGAGCAACTGGAGC	Asn	AC002479	80443 tggagcaactggagc 80457	5p15.2	NEU, glycoprotein C
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	AC004592	125445 tggagctgctggagt 125431	5q31	CD22-B
TGGAGTAGCTGGAGT	Ser	AC002393	3721 tggagtagctggagt 3735	6	glycoprotein
TGGAGTTGCTGGAGT	Cys	AC002326	114578 tggagttgctggagt 114564	6	G3P REGULON
TGGAGTGATGGAGT	Ala	Z84490	20244 tggagtgatggagt 20230	6	Alu, adrenergic receptor



表 2

アローブ	Xaa	7カシオン番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGGTTTCTGGAGC	Phe	AC002112	68699 tggagttcttggagc 68685	6	IgHv, MYD116
TGGAGCGGCTGGAGC	Gly	U89336	35829 tggagcggctggagc 35815	6p21	myosin HC, cep250,
TGGAGCGTCTGGAGC	Val	U53588	3558 tggagcgtctggagc 3572	6p21.3	ring finger, BRCA1
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	Z98744	38358 tggagtcgatggagt 38344	6p21.3-22.3	Alu, AD7c-NTP
TGGAGTTGCTGGAGT	Cys	AL009031	104325 tggagttgctggagt 104311	6p22.3-24.1	ACC synthase
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AL008729	21325 tggagtgtctggagt 21339	6p24	E1A, DUB-2
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	Z98755	69825 tggagtgttggagt 69811	6q16.1-21	dynein
TGGAGCTTCTGGAGC	Phe	Z98172	35554 tggagcttctggagc 35540	6q21	HGXPRT
TGGAGCAGGTGGAGC	Arg	Z97989	79116 tggagcaggtggagc 79102	6q21-22	syn fyn, slk, yes, src
TGGAGCTAATGGAGT	***	Z95326	16562 tggagctaattggagt 16576	6q22.1-6q22.33	tyrosinase
TGGAGCTCTTGGAGC	Ser	Z98049	25800 tggagctcttggagc 25786	6q26-q27	collagen, AT3, C1Qb
TGGAGCTCCTGGAGT	Ser	AC003090	22068 tggagctccttggagt 22082	7p15	ICE
TGGAGTATATGGAGC	Ile	AC004744	22740 tggagtatatggagc 22754	7p15-p21	TSH-R, RNABP
TGGAGTAGCTGGAGC	Ser	AC004485	86356 tggagtagctggagc 86370	7p15-p21	Hox 2.4, mLL1Ra(stop*)
TGGAGTCTTTGGAGT	Leu	AC004141	3130 tggagtcttggagt 3144	7p21-p22	polyprotein
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC004548	62876 tggagcagatggagc 62862	7q11.23-q21.1	NCAM
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	AC002456	69500 tggagcaactggagt 69514	7q21	glycoprotein A
TGGAGTAACTGGAGT	Asn	AC000064	9170 tggagtaactggagt 9184	7q21-22	GA3PD
TGGAGTTATTGGAGT	Tyr	AC003085	87341 tggagttattggagt 87355	7q21-22	Nmyc, FGFR
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC000119	65235 tggagttgttggagt 65221	7q21-7q22	FVIII, TopoIII
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC002458	44435 tggagttgttggagt 44421	7q21-q22	telomerase, NFAT
TGGAGTACATGGAGC	Thr	AC000059	9977 tggagtacatggagc 9963	7q21-7q22	Alu, Notch4

表 3

アローフ	Xaa	7代シグナル番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGTCAGTGGAGC	Gln	AC000119	103655 tggagtcagtgagc 103669	7q21.7q22	reverse transcriptase
TTGGAGTATTGGAGT	Ile	AC002384	52216 tggagtattggagt 52202	7q22	pol, GHR(another frame)
TGGAGCAGCTGGAGT	Ser	AC004522	55291 tggagcagctggagt 55277	7q22-q31.1	hemoglobin beta
TGGAGTGTGGAGT	Val	AC002466	43273 tggagtgtggagt 43287	7q31	ryanodine receptor, mTPO
TGGAGTGGCTGGAGC	Gly	AC002543	112948 tggagtggctggagc 112962	7q31.2	EGF, P-selectin
TGGAGCTGATGGAGC	***	AC000061	79564 tggagctgatggagc 79550	7q31.2	laminin B1, tubulin
TGGAGTTTTTGGAGT	Phe	AC000125	13750 tggagttttggagt 13736	7q31.3	p150
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC002498	20166 tggagttgtggagt 20152	7q31.3	IL3Rb(opposite)
TGGAGCGGCTGGAGC	Gly	U66059	158491 tggagcggctggagc 158477	7q35(TcRb)	properdin
TGGAGCATTTGGAGC	Ile	AC003109	4761 tggagcattggagc 4775	7q36	CD2, HOX-2.6
TGGAGTTATTGGAGT	Tyr	AF027390	174448 tggagttattggagt 174434	7q tel	IkB, V2R
TGGAGCATATGGAGT	Ile	AC002052	28882 tggagcatatggagt 28896	9p22	myosin VIIA, <b>OSMR</b>
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	AC001643	27345 tggagcaactggagt 27331	9q34	hox1.4, gastrinR
TGGAGCGGATGGAGC	Gly	AC002319	37518 tggagcggatggagc 37532	9q34	hox1.4, gastrinR
TGGAGTGAGTGGAGT	Glu	U73649	16394 tggagcggatggagc 16380	9q34	vWf, laminin a3
TGGAGTGGTGGAGT	Gly	U73649	16850 tggagtggatggagc 16836	11	zinc finger
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	U73629	31027 tggagtgcctggagt 31041	11	zinc finger
TGGAGCCCTGGAGT	Pro	U73629	36731 tggagccctggagt 36745	11	Alu, ep2b, BCGF-12
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	U73643	14550 tggagtccctggagc 14564	11	EZRIN, hemagglutinin
TGGAGCAACTGGAGC	Asn	<b>AF015116</b>	65621 tggagcaactggagc 65635	11p15.5	reverse transcriptase
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AC002350	23543 tggagtgcattggagt 23529	12q24	Nasopressin R, <b>OSMR</b>
					Alu, IFNaR

表 4

プローブ	Xaa	7つの番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AC004217	88822 tggagtcactggagt 88808	12q24.1	Alu, HPK
TTGGAGTTACTGGAGC	Tyr	AC002978	65893 tggagttactggagc 65907	12q24	clathrin LC, EPOR(nonWS)
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC000403	91715 tggagttgttggagt 91729	13	VHL, inhibin B
TGGAGCGGTTGGAGC	Gly	X97051	73621 tggagcgttggagc 73607	14q32.33 (IgD)	polycystic kidney
TGGAGTAGGTGGAGC	Arg	AC003024	15596 tggagtagtggagc 15582	15q26	pkcF
TGGAGTTTCTGGAGC	Phe	AC002492	93356 tggagtttcttggagc 93370	16	pol, PRER
TGGAGTTCATGGAGT	Ser	U91318	102406 tggagttcatggagt 102392	16	ICAM1, MIBP1
TGGAGTGTATGGAGT	Val	AC002289	10631 tggagtgtatggagt 10645	16	Alu
TGGAGCCACTGGAGT	His	U91318	152252 tggagccactggagt 152238	16	laminin alpha5
TGGAGTTAATGGAGT	***	AC002519	81768 tggagttaatggagt 81754	16	Rho, Notch
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	U91326	84127 tggagctgctggagt 84113	16p11.2	NIP1-like, IL2Rr(nonWS)
TGGAGTGCATGGAGT	Glu	AC002403	10952 tggagtcactggagt 10966	16p12	TPOR, ORR, and many
TGGAGCACTTGGAGC	Thr	AC002551	82245 tggagcacttggagc 82259	16p12.1	envelope, androgen R
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	AC002299	162 tggagtccttggagc 148	16p12-p13.1	CYCLIN H, FN
TGGAGCTATGGAGC	Tyr	AC002299	84540 tggagctattggagc 84526	16p12-p13.1	Alu, RNA editase
TGGAGTCACTGGAGT	His	U95737	16130 tggagtcactggagt 16144	16p13.1	TcRa, HLAA
			16374 tggagtcactggagt 16388		Notch, Pro-rich
			16599 tggagtcactggagt 16613		phosphatase, ORFB
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	U91318	112272 tggagtccttggagc 112286	16p18.11	CD30: collagen, MAP1a
TGGAGCACTTGGAGC	Thr	AC004509	26031 tggagcacttggagc 26045	16p13.3	TcRb
TGGAGCCCGTTGGAGC	Arg	AC004496	28217 tggagccgttggagc 28231	16p13.3	mucin, ET1, IL12R(nonWS)

表 5

プローブ	Xaa	アミノ酸番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGCCGCTGGAGC	Arg	AC004232	34550 tggagccgctggagc 34564	16p13.3	IgLk, AGPR
TTGGAGTACTTGGAGC	Thr	AJ003147	151180 tggagtacttggagc 151166	16p13.3	RanBP2
TGGAGCGTGTGGAGC	Val	X71874	11520 tggagcgttggagc 11534	16q22.1	collagen a5IV
TGGAGCAAATGGAGT	Lys	AC003663	114346 tggagcaaatggagt 114360	17	beta-D-glucosidase
TGGAGTCTCTGGAGC	Leu	AC003957	52898 tggagtctctggagc 52884	17	TTE-1, SEX, Rho,
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC003971	76277 tggagcagatggagc 76263	18	LIMK-1, TcR
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AD000812	30891 tggagtgcattggagt 30905	19	Alu
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AC002126	8651 tggagtgcattggagt 8665	19	Alu, AD7c.NTP
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	AC004660	10008 tggagctgctggagt 10022	19	Reps1
TGGAGCCCCCTGGAGT	Pro	AC004490	14389 tggagccccctggagt 14403	19	mucin, ataxin-2, N-WASP
TGGAGTGACTGGAGC	Gln	AC003112	18315 tggagtgaattggagc 18301	19p12(NRG)	TPOR, PRLR, OBR-alc
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC004004	39010 tggagcagatggagc 38996	19p12	PRLR, IL12R, GM-
			-----presumably a pseudogene-----		CSERb, IL11R(+stop codon)
			39177 tggagcagatggagc 39163		IL3Ra(weak, 22, nonWS)
TGGAGCACCTGGAGT	Thr	AD000685	21015 tggagcacctggagt 21001	19p13.1	GM-CSFRb(nonWS+stop)
TGGAGCTGATGGAGC	***	AC002115	37164 tggagctgatggagc 37178	19q13.1	Mpc2, Pro rich protein
TGGAGCCAGTGGAGC	Gln	M63796	7622 tggagccagtggagc 7636	19q13.3	NFCP, titin, Jagged 2
TGGAGTTACTGGAGT	Tyr	AC004505	31711 tggagtactggagt 31725	20	Gap junction
TGGAGTTGATGGAGC	***	Z93016	31093 tggagtgtatggagc 31079	20q12-13.2	smaphorin F, GHS-R, JAK2
TGGAGTCAATGGAGT	Gln	<b>U35677</b>	579 tggagtcattggagt 565	21(MX1)	GLI, <b>IL12R</b> , IL7R(nonWS)
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	AF039907	29892 tggagtgcctggagt 29906	21	IgY, Cyt.Oxidase
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AG000937	105 tggagtgtctggagt 91	21q	peroxidase

表 6

プローブ	Xaa	7レシオン番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGTAAATGGAGT	Lys	AP000034	28803 tggagtaaatggagt 28789	21q11.1	Na/Ca exchanger
TTGGAGTAGGTGGAGT	Arg	AP000039	24900 tggagtagtggagt 24914	21q11.1	RNA polymerase
TGGAGTGAGTGGAGT	Glu	AP000035	21721 tggagtgtgtggagt 21707	21q11.1	semaphorin F
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AG000038	26164 tggagtgtctggagt 26150	21q11.1	Glycoprotein
	Val	AP000038	26164 tggagtgtctggagt 26150	21q11.1	PKC
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	AP000045	7204 tggagtgcctggagt 7218	21q11.1	IgV
TGGAGCATTTGGAGC	Ile	AP000052	93726 tggagcatttggagc 93740	21q11.1	Ig H, TCF-3, CETP
TGGAGCCTCTGGAGC	Leu	AP000037	17581 tggagcctctggagc 17567	21q11.1	Alu, BCGF
TGGAGTGGGTGGAGT	Gly	AP000015	48480 tggagtgggtggagt 48494	21q22.2	TPO
TGGAGTGAGTGGAGT	Glu	Z97055	151632 tggagtgggtggagt 151618	22	semaphorin H, CD44
TGGAGCTGGTGGAGT	Trp	Z83856	8503 tggagctgggtggagt 8489	22	ERF
TGGAGTGGGTGGAGT	Gly	Z95113	69325 tggagtgggtggagt 69311	22q11.2-qter	factor H
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	Z93784	36348 tggagtgcattggagt 36362	22q11.2-qter	Alu, NF2
TGGAGCCTCTGGAGT	Leu	AC002308	130741 tggagcctctggagc 130727	22q11.2	collagen a1, Na channel
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	AC000086	40705 tggagtcctcggagc 40691	22q11.2	ADH, collagen
TGGAGCATCTGGAGC	Ile	L77569	21088 tggagcatctggagc 21074	22q11.2	Georgedathrin heavy chain 2
	Ile	AC000072	24248 tggagcatctggagc 24262	22q11.2	dathrin heavy chain 2
TGGAGCAGCTGGAGC	Ser	AC000092	9817 tggagcagctggagc 9803	22q11.2	IgHv, PC binding
TGGAGCAACTGGAGC	Asn	Z95116	64481 tggagcaactggagc 64495	22q12.1	p150, IL4RWSNWSF*
TGGAGCTAGTGGAGC	***	AC003071	114780 tggagctagtggagc 114794	22q12.1-qter	FGFRb
TGGAGCCCTTGGAGC	Pro	Z80902	2675 tggagcccttggagc 2661	22q12-qter	collagen a1
TGGAGCTCTTGGAGT	Ser	Z79999	40825 tggagctcttggagt 40839	22q12-qter	collagen a1,

表 7

プローブ	Xaa	アミノ酸番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGCCATTGGAGT	His	Z81308	12676 tggagccattggagt 12661	22q12-qter	MYF-8, p53, INK4a
TGGAGCGGAGTGGAGT	Glu	AL008637	85322 tggagcgaggaggagt 85336	22q12.3-13.2	GMI-GSFRb, IL3R, EPOR, etc
TTGGAGTGAGTGGAGT	Glu	U62317	77740 tggagtgaggaggagt 77726	22q13	latrophilin-related
TGGAGTGCAATGGAGT	Ala	Z48018	31082 tggagtgcatggagt 31068	22q13	Alu, G-CSFR, AD7c-NTP
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC002422	19151 tggagtgtggagt 19137	X	cGMP PDase
TGGAGTGCTCTGGAGT	Val	Z73418	31830 tggagtgtctggagt 31816	X	WNT-8D, Mi-2
TGGAGTCTTCTGGAGT	Leu	Z83843	114972 tggagttcttggagt 114958	X	reverse transcriptase
TGGAGTCTCTCTGGAGT	Leu	Z99706	7749 tggagttcttggagt 7735	X*	Selenoprotein
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	AC002420	70704 tggagcaactggagt 70690	X	homeoprotein, OBR(stop)
TGGAGCATGTGGAGT	Met	Z77219	5702 tggagcatgtggagt 5688	X	TcRb, PLAFR
TGGAGTTCCTGGAGC	Ser	Z83131	4904 tggagttcttggagc 4890	X	VPS41 homolog
TGGAGTGGCTGGAGC	Gly	AC004388	239975 tggagtggctggagc 239989	X	GAP, mIFR(stop)
TGGAGTGGCTGGAGC	Gly	AC004475	73509 tggagtgctggagc 73495	X	RNAse, mIFR(stop)
TGGAGTCTATGGAGC	Leu	Z70050	9934 tggagttcttggagc 9948	X	complement C8, C7
TGGAGTCTATGGAGC	Leu	Z73986	40766 tggagttcttggagt 40780	X	complement C8, C7
TGGAGCTGTTGGAGC	Cys	L44140	112657 tggagctgttggagc 112671	X	rab GDI alpha, BDGF
TGGAGCTCATGGAGC	Ser	AC004383	144906 tggagctcatggagc 144892	X	RTase, transposon
TGGAGTAAATGGAGC	Lys	Z69732	31681 tggagtaaatggagc 31695	Xp11	OT-R, acrosin
TGGAGITCGTGGAGC	Ser	Z92545	88703 tggagttcgtggagc 88717	Xp11	PMK1
TGGAGCTTCTGGAGC	Phe	AL008709	46089 tggagcttctggagc 46075	Xp11.23-Xp11.4rMHC class Ia, HLA-C	
TGGAGTTTCTGGAGT	Phe	U96409	116332 tggagtttcttggagt 116346	Xp22	myosin H
TGGAGTTGCTGGAGT	Cys	AC003106	89544 tggagttgctggagt 89530	Xp22	IFN

表 8

アローブ	Xaa	7パシヨ/番号	ヒットした位置	座位	blastx (expect=100)
TGGAGTCACTGGAGT	His	AL021706	11982 tggagctactggagt 11968	Xq21.1-21.33	dopamine receptor
TGGAGCTGGTGGAGT	Trp	AC000113	119188 tggagctggaggagt 119202	Xq23	DNA repair protein, MHC
TGGAGCAAGTGGAGT	Lys	AF007262	98212 tggagcaagtgaggagt 98226	Xq28	RNA polymerase
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	U82671	35792 tggagctgctggagt 35806	Xq28	XTCF-3c
TGGAGTCAGTGGAGC	Gln	AF011889	144465 tggagtcagtgaggc 144451	Xq28	GHRHR, Werner Synd.
TGGAGCTAATGGAGC	***	AF030876	107409 tggagctaattggagc 107395	Xq28	gp41, clk3
	***	AF031078	94338 tggagctaatggaggc 94424	Xq28	gp41
	***	Z47046	5688 tggagctaatggaggc 5624	Xq28	gp41
TGGAGTTTCTGGAGT	Phe	AC002531	106698 tggagtttctggagt 106712	Y	Alu, hpk
TGGAGCAGTTGGAGC	Ser	AC004474	124745 tggagcagttggagc 124731	Y	EGFR, Smad6
TGGAGTTTGTGGAGT	Leu	U26425	12899 tggagtttgtggagt 12913	PLCb2	PRLR(opposite)
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	U96726	61672 tggagcaactggagt 61658	mouse DNA	envelope mIL1R(opposite)
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	<b>U15323</b>	22244 tggagtccttgaggc 22230	MHC class II	CFTC, <b>IL6Rb</b>
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC002482	14276 tggagcagatggagc 14290	RG208O03	I-309, TcR, IL9R(nonWS)
TGGAGCTCTTGGAGC	Ser	U34879	24914 tggagctcttgaggc 24928	EDH17B2	Large tegument protein
TGGAGCCTTTGGAGC	Leu	Z15025	6359 tggagccttttgaggc 6373	Bat2	commonB(oppsit.nonWS)
GM-CSFRb(opposite.ston)					bat2.mucin,

過剰 (Redundant) クローンを影で示した。白抜きとアンダーラインはそれぞれヒットおよび偽ヒット (Pseudo-hits) を示す。

さらにこの28クローンのうち4クローン (AC002303、AC003112、AL008637及びAC004004) は複数の既知ヘモポエチン受容体をヒットしたがAC004004はTrp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフの3アミノ酸下流に終止コドンが存在していることから除外した。残る3クローンのうちAL008637は既知受容体であるGM-CSF受容体 $\beta$ と考えられた。AC002303はTIGRグループにより1997年6月19日に登録されたヒト第16染色体16p12領域由来のBACクローンCIT987-SKA-670B5であり全長131530塩基対からなる (Lamerdin, J.E., et al., GenBank Report on AC003112, 1997)。

図1に示す様にAC002303配列中唯一存在するプローブ配列、tggagtgaatggagt (40952-40966) を含む40861-41040の180塩基を質問式 (query) としたBlastX検索によりTP0受容体、レプチン受容体を初めとする多数のヘモポエチン受容体が明らかな相同性を示したが質問式 (query) 配列と完全に一致する既知ヘモポエチン受容体はデータベースに登録されていなかった。また、上記180塩基の配列を中心に5'、3'両方向に順次180塩基の配列を切り取って質問式 (query) とし、上記条件にてBlastXスキャンを実施した結果さらに2つの既知ヘモポエチン受容体と相同性を示す配列を39181-39360及び42301-42480の領域に見出し同一遺伝子の他のエクソンと考えられた (図2)。

39181-39360の部位にはPro-richモチーフPAPPF、42301-42480の部位にはBox 1モチーフが保存されていた。Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフを含むエクソンに隣接する3'側エクソンは細胞膜貫通ドメインが載っているが、このドメインは他のヘモポエチン受容体との相同性が低くBlastXスキャンでは検出されなかった。以上の結果より、上記BACクローンCIT987-SKA-670B5に新規ヘモポエチン受容体遺伝子が存在する可能性が示唆された。

#### [実施例2] RT-PCRによるNR8発現組織の検索

ヘモポエチン受容体の幾つかについては偽遺伝子の存在が報告されている (Kermouni, A. et al., Genomics 29 (2), 1995, 371-382、Fukunaga, R. and Nag



ata, S., Eur. J. Biochem., 1994, 220, 881-891)。NR8が偽遺伝子でないことを確認することおよびNR8発現組織の同定を目的に、NR8遺伝子の転写産物の検索をRT-PCR法にて実施した。

上記BACクローンAC002303の配列内において、既知サイトカインレセプターにアミノ酸翻訳レベルで、広く保存されている複数のエクソン領域を予測し、その予測したエクソン領域の配列上に以下のプライマーを合成した（各プライマーの位置は図5参照）。

NR8-SN1; 5' - CCG GCT CCC CCT TTC AAC GTG ACT GTG ACC -3' (配列番号: 9)

NR8-SN2; 5' - GGC AAG CTT CAG TAT GAG CTG CAG TAC AGG -3' (配列番号: 10)

NR8-AS1; 5' - ACC CTC TGA CTG GGT CTG AAA GAT GAC CGG -3' (配列番号: 11)

NR8-AS2; 5' - CAT GGG CCC TGC CCG CAC CTG CAG CTC ATA -3' (配列番号: 12)

Human Fetal Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech#K1425-1)を鋳型として用いて、上記プライマーの組合わせによるRT-PCRを試みた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1)を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記の実験条件にて実施した。

即ち、PCR条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、72°Cで3分」を5サイクル、「94°Cで20秒、70°Cで3分」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで3分」を28サイクル、72°Cで4分、および4°Cにて終結、である。

図5に示したプライマーの位置から、SN1/AS1、SN1/AS2、SN2/AS1、SN2/AS2の組み合わせでそれぞれ、330bp、258bp、234bp、162bpのサイズのバンドの増幅が期待される。ヒト胎児肝、脳、骨格筋cDNAを鋳型として検討した結果、胎児肝についてのみそれぞれのプライマーの組み合わせで予想されたサイズの明瞭なバンドが観察された（図3）。

これに対して胎児脳 cDNA では全く増幅を認めず、胎児骨格筋では約650bpのバンドと400-500bpのブロードなバンドが観察された。しかし胎児骨格筋の場合のバンドのサイズは異なる組み合わせのプライマーを用いた場合でも一定であったことから何らかの理由による非特異的な増幅と考えられた。

得られたPCR産物を、pGEM-T Easy vector (Promega#A1360)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase(Promega#A1360)によって、4°C/12時間の反応をおこなった。PCR産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5a (Toyobo#DNA-903)を形質転換することによって得られた。

また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready (Toyobo#PIK-101)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI/Perkin Elmer#4303141)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。独立する10クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、全クローンともに単一の塩基配列を示した。この得られた配列が、NR8の部分塩基配列であることを確認した。

### 〔実施例3〕 5'-及び3'-RACE法による完全長 cDNA クローニング

次にこの胎児肝由来 cDNA を用いて完全長 cDNA を得るべく、5'-RACE、3'-RACE法を実施した(図4)。

#### 3-1) 5'-RACE法

前記のNR8-AS1プライマーを一次PCRに用い、また、NR8-AS2プライマーを二次PCRに用いて5' RACE-PCRを試みた。鋳型としてHuman Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7403-1)を用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記のPCR条件で行った結果、選択的スプライシングによる二種類のサイズを示すPCR産物が得られた。

一次PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、72°Cで4分」を5サイクル、「9

4°Cで20秒、70°Cで4分」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで4分」を28サイクル、72°Cで4分、および4°Cにて終結である。

二次PCRの条件は、94°Cで4分、「94°Cで20秒、70°Cで3分30秒」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで3分30秒」を28サイクル、72°Cで4分、および4°Cにて終結である。

得られた二種類のPCR産物は双方とも、前記同様、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、独立する16クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。その結果、塩基対の長さ、及び配列の相違により、14クローンと2クローンの二種類のグループに区別することができた（これは、後述するが、選択的スプライシングに起因する産物の相違であり、独立する14クローンのグループはゲノム配列においてエクソン5に相当する配列を含み、残る独立した2クローンのグループにはこの配列が含まれていない）。

### 3-2) 3'-RACE法

前記のNR8-SN1プライマーを一次PCRに用い、また、NR8-SN2プライマーを二次PCRに用いて3' RACE-PCRを試みた。鋳型として5' RACE-PCR同様、Human Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Libraryを用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。PCR条件は前記、3-1)に示した通りで行った結果、シングルバンドのPCR産物が得られた。

得られたPCR産物を、前記同様、pGEM-T Easy vectorにサブクローニングし、独立する12クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。この結果、独立した全12クローンともに単一の塩基配列を示した。

5'-RACE、3'-RACEでそれぞれ増幅された断片（約1.1kbと1.2kb）の塩基配列

を解析した結果、それぞれの断片は互いに約260bp重複して5'側、3'側に伸びた配列でNR8 mRNAのほぼ全長を含むと考えられたことからこれを連結して全長cDNA (NR8 $\alpha$ )とした(図5、図6)。なお、NR8 $\alpha$  cDNA (配列番号: 2)を含有するプラスミドはpGEM-NR8 $\alpha$ と命名され、該プラスミドを含有する大腸菌は、平成10年(1998年)10月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託番号FERM BP-6543として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

図5および図6に示す様に、NR8 $\alpha$  cDNAのORFは塩基番号441から始まるMetが39bp上流のインフレーム(in frame)終止コドンの存在から開始コドンと考えられ、塩基番号1524から始まる2個の終止コドンで終了する。N末端側から順に、典型的な分泌シグナル配列、他のヘモポエチン受容体メンバーに保存されたCys残基を含むリガンド結合部位と考えられるドメイン、Pro-リッチモチーフ、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフ、細胞膜貫通ドメイン、シグナル伝達に関与すると考えられるBox1モチーフ等のヘモポエチン受容体の特徴を備えている。以上の結果から、NR8遺伝子は新規なヘモポエチン受容体をコードしているものと考えられた。

RACE法で増幅された断片を解析した結果、スプライス変異体の存在が示唆された。塩基配列解析の結果、この変異体は上記NR8 $\alpha$ のPro-リッチモチーフを含む約150bpを欠失していることが明らかとなった。さらにAC002303の配列とNR8 $\alpha$ との比較からエクソン・イントロンの類推を行った結果(表9)、上記変異体は表9中の第5エクソンを選択的スプライシングにより欠失しているものと考えられた。

表 9

イカリ	# in AC002303	# in NR8	特徴
1	<1	: 1-424	インフレーム終始コドン
2	26334-26398	: 425-489	開始コドン, シグナルハーフスト
3	30625-30727	: 490-592	保存 Cys 残基
4	33766-33965	: 593-792	保存 Cys 残基, N-グリコシル化部位
5	39240-39394	: 793-947	Pro-リッチモチーフ(PAPPF), N-グリコシル化部位
6	40820-40997	: 948-1125	gtWSEWSdp モチーフ
7	41455-41554	: 1126-1225	膜貫通ドメイン
8	42285-42366	: 1226-1307	Box1 (IWAVPSP)
9a	44812-44909	: 1308-1405*	イカリ 10 への接続, Box2 様配列 (PSTLEVYYSCH), 非典型的なイカリ/イントロン境界
9b	44812-45922<	: 1308-2465**	二重の終始コドン, Box2 様配列 (PSTLEVYYSCH, PAELVESDG), poly A
10	45441-45922<	: 1406-1934*	二重の終始コドン, poly A
NR8 $\alpha^*$ :	イカリ 1+2+3+4+5+6+7+8+9a+10		
NR8 $\beta$ :	イカリ 1+2+3+4+6+7+8+9a+10(可溶型および膜貫通(-signal)型のための2つのシグナルペプチド読み取り)		
NR8 $\gamma^{**}$ :	イカリ 1+2+3+4+5+6+7+8+9b		

この変異体 (NR8 $\beta$ ) は第4エクソンに第6エクソンが直結してフレームシフトが起こりトランケートドフォーム (runcated form) の可溶性受容体をコードすることが可能である。またエクソンとイントロンの境界は殆どの場合コンセンサス配列をとっているが、唯一第9エクソン (Exon 9a) と第9イントロンの境界だけ acc/acggag とコンセンサス配列 (nag/gtgagt 等) とは異なっている。なお、NR8 $\beta$  cDNA (配列番号: 4) を含有するプラスミドは pGEM-NR8 $\beta$  と命名され、該プラスミドを含有する大腸菌は、平成10年 (1998年) 10月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に寄託番号 FERM BP-6544 として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### [実施例4] ノーザンブロッティング

各ヒト臓器、及びヒト癌細胞株における NR8 の遺伝子発現分布、及び、遺伝子発現様態を解析するために、実施例3にて得られた全ての cDNA 断片を基に調製した NR8 $\alpha$  蛋白質全長をコードする cDNA をプローブとして用い、ノーザン解析を行った。プローブの調製は、Mega Prime Kit (Amersham, cat#RPN1607) を使用し、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham, cat#AA0005) によって標識した。

ノーザンブロットは Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (Clontech #7760-1), Human MTN Blot IV (Clontech#7766-1), Human Cancer Cell Line MTN Blot (Clontech#7757-1) を用いた。ハイブリダイゼーションは Express Hyb Hybridization Solution (Clontech#8015-2) を使用した。

ハイブリダイゼーションの条件は 68°C/30 分のプレハイブリダイゼーションの後、68°C/14 時間のハイブリダイゼーションを実施した。下記の条件にて洗浄をおこなった後、Imaging Plate (FUJI#BAS-III) に露光し、Image Analyzer (FUJIX, BAS-2000 II) によって、NR8 mRNA の遺伝子発現を検出した。洗浄条件は、(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で5分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで30分、(3) 0.1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで30分である。

NR8 の各臓器における発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を

図12に示す。5kbおよび3-4kbに2本の計3本の異なるサイズのmRNAが成人肺、脾臓、胸腺、骨格筋、膵臓、小腸、末梢白血球、子宮に検出された。さらに造血系細胞株を含む種々の細胞株についても同様に検討したところ、前骨髄性白血病細胞株であるHL60とバーキットリンフォーマ由来Rajiの2株において同じサイズのバンドを認めた。

#### [実施例5] ブラークスクリーニング

ノーザン解析によるNR8遺伝子の発現解析の結果、NR8遺伝子の発現が認められた各ヒト臓器、および各ヒト癌細胞株のそれぞれにおいて、少なくともサイズの異なる3種類の特異的なmRNAのバンドが検出された。しかしながら、本発明者らは上記実施例においては、2種類の選択的スプライシング変異体、即ちNR8 $\alpha$ およびNR8 $\beta$ の遺伝子の単離にしか成功していない。そこで、第3の選択的スプライシング変異体の遺伝子単離を目的としたブラークスクリーニングを試みた。cDNAライブラリーとして、前述のノーザン解析の結果、強いNR8遺伝子の発現が認められたHuman Lymph Node (Clontech, cat#HL5000a) を用いた。また、プローブにはNR8 $\alpha$  cDNA断片を用いた。プローブの標識は、Mega Prime Kit (Amersham, cat#RPN1607) を使用し、[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham, cat#AA0005) によってラジオアイソトープ標識した。約 $7.2 \times 10^5$ ブラークのHuman Lymph Node cDNA Libraryを、Hybond N(+) (Amersham, cat#RPN303B) 付電荷ナイロン膜にブロッティングし、一次スクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、Rapid Hybridization Buffer (Amersham, cat#RPN1636) を使用した。ハイブリダイゼーションの条件は、65°Cで1時間のプレハイブリダイゼーションの後、65°Cで14時間のハイブリダイゼーションを実施した。(1)  $1 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ , 室温で15分、(2)  $1 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ , 58°Cで30分、(3)  $0.1 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ , 58°Cで30分の条件にて洗浄を行った後、X線フィルム (Kodak, cat#165-1512) に露光し、NR8陽性ブラークを検出した。

その結果、陽性あるいは疑陽性を示す、独立した16クローンが得られた。一

次スクリーニングにより得られたこの16クローンに対し、同様に二次スクリーニングを行った結果、NR8陽性を示す、独立した15クローンのブランクの単離に成功した。これら15クローンのインサート断片は、 $\lambda$ gt10ベクタークローニング部位の両端に位置するプライマー対によってPCR増幅された。PCR反応には、Advantage cDNA polymerase Mix (Clontech#8417-1) を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用し、下記の実験条件にて実施した。即ち、94°Cで4分、「94°Cで20秒、70°Cで4分」を5サイクル、「94°Cで20秒、68°Cで4分」を30サイクル、72°Cで4分、および4°Cにて終結である。

得られたPCR産物は、上記と同様に、pGEM-T Easy vectorにサブクローニングし、インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing SF Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer#4303150) を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析を行った。その結果、得られた15クローンのうち、少なくとも2クローンにおいて、NR8 $\alpha$ のC末端近傍に177アミノ酸の挿入を認め、この部分がNR8遺伝子の第9イントロンに由来し、NR8 $\alpha$ ではスプライシングにより除去されていることから、この第3の選択的スプライシング変異体を、本発明者らはNR8 $\gamma$ と命名した。なお、NR8 $\gamma$  cDNA (配列番号：8) を含有するプラスミドはpGEM-NR8 $\gamma$ と命名され、該プラスミドを含有する大腸菌は、平成10年(1998年)10月9日に工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託番号FERM BP-6545として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ここで得られた15クローンの内、その後さらに上記2クローン以外にも4クローンを選択して同様に塩基配列を解析した。その結果、選択された合計6クローンの内、2クローンがNR8 $\beta$ の塩基配列を示し、残る4クローンは全てNR8 $\gamma$ の塩基配列を示した。従ってここで塩基配列を解析した6クローンの中にNR8 $\alpha$ の配列は含まれていなかった。また、配列を決定したNR8 $\gamma$  cDNA クローンの3'-UTR は、3'-RACE によって得られたNR8 $\alpha$ の3'-UTR 末端配列(3UTR-1)よ



り 483 bp 伸長された部位に poly A テールが付加(3UTR-2)される cDNA クローンと、2397 bp 伸長された部位に poly A テールが付加(3UTR-3)される cDNA クローンの存在が確認された。一方、上記によって配列を決定した 2 クローンの NR8 $\beta$  においては、何れも 3UTR-3 の塩基配列を含んでいた。下記の表 10 に、これまでに得られた cDNA クローンが保持していた 3' 末端非翻訳領域配列をまとめた。また、NR8 $\gamma$  cDNA 配列の翻訳終止コドンから起算した場合の 3UTR-1、3UTR-2 及び 3UTR-3 の塩基配列を、それぞれ配列番号：23、配列番号：24 及び配列番号：25 に示した。

さらに NR8 $\beta$  cDNA 配列の翻訳終止コドンから起算した場合の 3UTR-B1、及び 3UTR-B3 の塩基配列を、それぞれ配列番号：26 および配列番号：27 に示した。

表 10

NR8 cDNA クローン	3'-UTR 配列
NR8 $\alpha$	3UTR-1
NR8 $\beta$	3UTR-B1, 3UTR-B3
NR8 $\gamma$	3UTR-1, 3UTR-2, 3UTR-3

以上によって得られた塩基配列より、NR8 の遺伝子転写産物は選択的スプライシングの相違のみならず、3' 末端非翻訳領域配列の長さによっても種々の異なるサイズをコードし得ることが判明した。このことは、ノーザン解析によって検出された、種々のサイズを示す転写産物の存在を十分に説明しうる。

#### 6)-1 NR8キメラ受容体の構築

NR8に特異的に結合し得るリガンド、即ち新規ヘモポエチンを検索するためのスクリーニング系を構築した。先ず最初にNR8 $\alpha$ の細胞外領域（配列番号：1のアミノ酸配列；1位のMetから、228位のGluまで）をコードするcDNA配列をPCRによって増幅し、このDNA断片を既知のヘモポエチン受容体の細胞膜貫通領域、及び細胞内領域をコードするDNA断片とインフレーションで結合させることによって、キメラ受容体をコードする融合配列を作製した。ここで、パートナーとなる既知ヘモポエチン受容体として、前述のようにいくつかの候補が挙げられたが、その中からヒトTP0受容体(Human MPL-P)を選択して用いた。すなわち、ヒトTP0受容体の細胞膜貫通領域を含む細胞内領域をコードするDNA配列をPCRによって増幅した後、NR8 $\alpha$ の細胞外領域をコードするcDNA配列と、インフレーションで結合させ、哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクターに挿入した。構築した発現ベクターをpEF-NR8/TP0-Rと名付けた。また、構築したNR8/TP0-Rキメラ受容体の構造の模式図を図14に、さらに、構築したキメラ受容体の塩基配列とそれがコードする発現可能なアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：13および14に示す。NR8/TP0-Rキメラ受容体発現ベクターはブラストサイジンS耐性遺伝子を含む発現ベクターpSV2bsr（科研製薬株式会社製）と共に増殖因子依存性細胞株Ba/F3に導入して強制発現させた後、8 $\mu$ g/mlの塩酸ブラストサイジンS（科研製薬株式会社製）とIL3の共存下で培養することにより遺伝子導入細胞を選別した。得られたキメラ受容体導入細胞をIL-3非存在下に切り替え、標的リガンドを含むことが期待される材料を添加して培養することにより、NR8と特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ生存／増殖可能であることを利用したスクリーニングが実施可能である。

#### 6)-2 NR8/IgG1-Fc可溶性融合蛋白質の調製

細胞膜結合型リガンドの探索、あるいはBIAcore（Pharmacia社）やウエスタン法による可溶性リガンドの検出に利用すべくNR8/IgG1-Fc可溶性融

合蛋白質の調製を行った。5)-1項で調製したNR8 $\alpha$ の細胞外領域（アミノ酸配列；1位のMetから、228位のGluまで）をコードするDNA断片をヒト免疫グロブリンIgG1のFc領域をコードするDNA断片とインフレームで結合させることによって、該可溶性融合蛋白質をコードする融合配列を作製した。構築したNR8/IgG1-Fcがコードする可溶性融合蛋白質の構造の模式図を図14に、さらに、その塩基配列とそれがコードする発現可能なアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：15および16に示す。該融合遺伝子断片を哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクターに挿入し、構築した発現ベクターをpEF-NR8/IgG1-Fcと名付けた。このpEF-NR8/IgG1-Fcを哺乳動物細胞に強制発現させ、安定した遺伝子導入細胞を選択した後、その培養上清に分泌される当該リコンビナント蛋白質を、抗ヒトIgG1-Fc抗体を用いた免疫沈降、あるいはアフィニティーカラム等により精製することが可能である。

#### 6)-3 NR8 $\beta$ の発現系構築とリコンビナントNR8 $\beta$ 蛋白質の精製

細胞膜結合型リガンドの探索、あるいはBIAcore（Pharmacia社）やウエスタン法による可溶性リガンドの検出に利用すべくリコンビナントNR8 $\beta$ 蛋白質の調製を行った。NR8 $\beta$  cDNAのアミノ酸コーディング配列を用い、終止コドンを変異によって任意のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換した後、インフレームでFLAGペプチドをコードする塩基配列に結合させた。その結合断片を哺乳動物細胞で発現可能なプラスミドベクターに挿入し、構築した発現ベクターをpEF-BOS/NR8 $\beta$  FLAGと名付けた。構築した発現ベクター中の挿入断片NR8 $\beta$  FLAGの構造の模式図を図14に示す。さらにNR8 $\beta$  FLAGの塩基配列と、それがコードする発現可能なアミノ酸配列を配列番号：17および18に示す。このpEF-BOS/NR8 $\beta$  FLAGを哺乳動物細胞に強制発現させ、安定した遺伝子導入細胞を選択した後、その培養上清に分泌される当該リコンビナント蛋白質を、抗FLAGペプチド抗体を用いて免疫沈降を行うことが可能であり、あるいはアフィニティーカラム等により精製することが可能である。

## [実施例 7] マウス NR8 (mNR8) 遺伝子の単離

### 7-1) ヒト NR8 プライマーを用いたマウス相同遺伝子の単離

ヒト NR8 の全長 cDNA を単離する際に用いたオリゴヌクレオチドプライマーである、センス側（下流方向）の NR8-SN1 と NR8-SN2（配列番号：9 および 10）、またアンチセンス側（上流方向）の NR8-AS1 と NR8-AS2（配列番号：11 および 12）を利用して、異種間交叉 PCR クローニングを試みた。上記のヒト NR8 プライマーの組合わせにより、4 通りのプライマーセットが構成可能である。すなわち、[NR8-SN1 対 NR8-AS1]、[NR8-SN1 対 NR8-AS2]、[NR8-SN2 対 NR8-AS1]、及び [NR8-SN2 対 NR8-AS2] の組合わせを用い、マウス脳 cDNA (Clontech #7450-1)、及びマウス精巣 cDNA (Clontech #7455-1) ライブラリーを鋳型として実施することによって、交叉 PCR 産物の増幅を期待した。PCR 反応には Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1) を使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、下記のサイクル条件にて実施することで、同受容体のマウス相同遺伝子をコードし得る部分塩基配列の増幅を試みた。

即ち、交叉 PCR 条件は、94°C で 4 分、「94°C で 20 秒、72°C で 1 分」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、70°C で 1 分」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、68°C で 1 分」を 28 サイクル、72°C で 4 分、および 4°C にて終結、である。

この結果、図 15 に示す通り、何れのプライマーセットを用いた場合でも交叉 PCR 産物の増幅が認められた。また、マウス精巣 cDNA を鋳型として用いた場合より、マウス脳 cDNA を鋳型としたときの方がより鮮明な増幅産物を得ることができた。

### 7-2) NR8 に対応するマウス相同遺伝子の部分塩基配列の決定

7-1) で得られた増幅産物のうち、マウス脳 cDNA 由来の産物を pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR 産物の pGEM-T Easy vector への組換えは、T4 DNA Ligase (Promega #A1360)

によって、4 °C /12時間の反応をおこなった。PCR 産物と pGEM-T Easy vector の遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5 $\alpha$  (Toyobo #DNA-903)を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready Blue (Toyobo#PIK-201)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI/Perkin Elmer#4303154)を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析をおこなった。独立する 8 クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、同一の転写産物に由来する塩基配列が得られ、それらが共に mNR8 の部分塩基配列である事を認めた。得られた部分塩基配列を配列番号：28に示す。

#### 7-3) マウス NR8 遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーの設計

7-2)で得られた mNR8 の部分塩基配列をもとに、マウス NR8 に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの設計をおこなった。下に配列を記す通り、センス側（下流方向）に mNR8-SN3 を、またアンチセンス側（上流方向）に mNR8-AS3 をそれぞれ合成した。プライマーの合成には、ABI 社の 394 DNA/RNA Synthesizer を使用し、5'-末端トリチル基付加条件にて実施した。その後、OPC column (ABI#400771) にて、完全長の合成産物を精製した。これらプライマーは後述の 5'-RACE 法、及び 3'-RACE 法に提供した。

mNR8-SN3 ; 5'- TCC AGG CGC TCA GAT TAC GAA GAC CCT GCC -3' (配列番号：29)

mNR8-AS3 ; 5'- ACT CCA GGT CCC CTG GTA GGA GGA GCC AGG -3' (配列番号：30)

#### 7-4) 5'-RACE 法による N 末端 cDNA のクローニング

mNR8 の全長 cDNA を単離するために、NR8-AS2 プライマー（配列番号：12）を一次 PCR に用い、また、前項の mNR8-AS3 プライマー（配列番号：30）を二次 PCR に用いて 5'-RACE PCR を試みた。鋳型として Mouse Brain Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7450-1)を用い、PCR 実験には Advantage cDNA

Polymerase Mix を使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、下記の PCR 条件で実施した結果、2 種類のサイズの異なる PCR 産物が得られた。

一次 PCR の条件は、94°C で 4 分、「94°C で 20 秒、72°C で 100 秒」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、70°C で 100 秒」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、68°C で 100 秒」を 28 サイクル、72°C で 3 分、および 4°C にて終結である。

二次 PCR の条件は、94°C で 4 分、「94°C で 20 秒、70°C で 100 秒」を 5 サイクル、「94°C で 20 秒、68°C で 100 秒」を 25 サイクル、72°C で 3 分、および 4°C にて終結である。

得られた 2 種類の PCR 産物は共に、前記同様、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR 産物の pGEM-T Easy vector への組換えは、T4 DNA Ligase によって、4°C /12 時間の反応をおこなった。PCR 産物と pGEM-T Easy vector の遺伝子組換え体は、大腸菌株 DH5 $\alpha$  を形質転換することによって得られた。また、遺伝子組換え体の選別も前述と同様に、Insert Check Ready Blue を用いた。塩基配列の決定においても、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit を使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencer によって解析を実施した。独立する 8 クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、塩基対の長さ、及び配列の相違により、それぞれ 4 クローンずつの 2 種類のグループに区別することができた。これは、選択的スプライシングに起因する産物の相違であり、この得られた配列が、双方共に完全長 mNR8 cDNA クローンの N 末端配列を含んでいることを認めた。ここで、プロリンに富む領域 (Pro-rich 領域) をコードするエキソンを含む長い ORF を保有する cDNA クローンを mNR8 $\gamma$  と命名し、Pro-rich 領域を保有しない短い ORF をコードする cDNA クローンを mNR8 $\beta$  と命名した。これらの cDNA クローンはそれぞれ、ヒト NR8 $\gamma$ 、及びヒト NR8 $\beta$  の異生物種相同遺伝子に相当する。

#### 7-5) 3'-RACE 法による C 末端 cDNA のクローニング

mNR8 の全長 cDNA を単離するために、NR8-SN1 プライマー（配列番号：9）を一次 PCR に用い、また、mNR8-SN3 プライマー（配列番号：29）を二次 PCR に用いて 3'-RACE PCR を試みた。鋳型として Mouse Brain Marathon-Ready cDNA Library を用い、PCR 実験には Advantage cDNA Polymerase Mix を使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、前記同様の PCR 条件で実施した結果、単一のサイズを示す PCR 産物が得られた。得られた PCR 産物は、前記 7-2) の記載に従い、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、塩基配列を決定した。独立する 4 クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列の決定をおこなった結果、完全長 mNR8 cDNA クローンの C 末端配列を含んでいることを認めた。この 3'-RACE-PCR の結果、決定できた塩基配列と、前記 7-4) において決定した 5'-RACE-PCR 産物の塩基配列とを総合することによって、最終的に完全長 mNR8 $\gamma$ 、及び完全長 mNR8 $\beta$  cDNA の全塩基配列を決定した。決定した mNR8 $\gamma$  cDNA の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：22 および 21 に示す。また、決定した mNR8 $\beta$  cDNA の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を配列番号：20 および 19 に示す。

アミノ酸配列をヒトとマウスの NR8 間において比較したところ、NR8 $\gamma$  では 98.9% の高い相同性が認められ、一方 NR8 $\beta$  においても 97.2% の相同性を認めた。この結果は、同受容体遺伝子が生物種間を越えて重要な機能責任を担っている可能性を強く示唆するものである。ヒト及びマウス NR8 $\beta$  のアミノ酸配列を比較した結果を図 16 に記載した。また、ヒト及びマウス NR8 $\gamma$  のアミノ酸配列を比較した結果を図 17 に記載した。

最終的に単離した mNR8 $\gamma$ 、及び mNR8 $\beta$  の完全長 cDNA の両者はヒト NR8 同様の選択的スプライシングによって、538 アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体蛋白と、144 アミノ酸からなる可溶性受容体様蛋白をそれぞれコード可能であ

った。mNR8 $\gamma$ の特徴として以下の構造が認められる。先ず最初にアミノ酸番号1位のMetから19位のGlyまでが典型的な分泌シグナル配列であると予測される。ここで、1位のMetよりマイナス13位の位置に、インフレームの終止コドンが存在するため、このMet残基が翻訳開始コドンであると推定される。次に25位のCysから35位のCys残基までが、典型的なリガンド結合部位配列であり、さらに65位と109位のCys残基は他のヘモポエチン受容体メンバーにもよく保存されたCys残基の繰り返し構造を示す。続いて120位、及び122位と123位に連続するPro残基によって、Pro-rich領域が保存されており、さらに、214位のTrpから218位のSer残基までに典型的なWSXWS-box (WSモチーフ)が認められる。これら細胞外領域における構造的特徴に続き、233位のGlyから255位のLeu残基までの23アミノ酸に典型的な細胞膜貫通ドメインを保有している。さらに、その直後の細胞内領域における271位、及び273位のPro残基は、他のヘモポエチン受容体メンバーにもよく保存されたBox-1コンセンサス配列(PXPモチーフ)であり、ここがシグナル伝達に深く関与すると考えられる。以上のようにmNR8 $\gamma$ はヘモポエチン受容体メンバーの特徴を十分に満足させる。

一方、mNR8 $\beta$ においては、上記細胞外領域における構造的特徴のうち、Pro-rich領域をコードするエキソン配列が選択的スプライシングによってスキップされ、WSモチーフをコードする次のエキソン部位に直結する。しかし、フレームシフトによって、WSXWS-box配列は読み枠から外れ、144位のLeu残基までをコードした後、次の終止コドンによって翻訳フレームが終結する。これによって、細胞膜貫通ドメインを保持しない、可溶性ヘモポエチン受容体様蛋白をコードしている。

#### [実施例8] マウスNR8遺伝子の発現解析

##### 8-1) RT-PCR法によるマウスNR8遺伝子発現様態の解析

各マウス臓器におけるNR8遺伝子の発現分布、及び、遺伝子発現様態を解析



するために、RT-PCR 解析法による mRNA の検出を行った。RT-PCR 解析に用いるプライマーとして、センス側（下流方向）プライマーに NR8-SN1 プライマー（配列番号：9）を選択し、アンチセンス側（上流方向）プライマーに NR8-AS1 Primer を選択した。鋳型として、Mouse Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech #K1423-1)を用いた。PCR には Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech#8417-1) を使い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用した。PCR 反応は下記のサイクル条件にて実施することで、標的遺伝子の増幅を試みた。

PCR 条件は、94℃で 4 分、「94℃で 20 秒、72℃で 1 分」を 5 サイクル、「94℃で 20 秒、70℃で 1 分」を 5 サイクル、「94℃で 20 秒、68℃で 1 分」を 24 サイクル、72℃で 3 分、および 4℃にて終結、である。

RT-PCR の結果を図 18 に示す通り、精巣、及び 17 日目胚において同遺伝子の強発現が検出されたほか、解析をおこなった全てのマウス臓器、及び組織由来の mRNA において構成的な遺伝子発現が認められた。また解析に使用した全ての鋳型に対して、マウス G3PDH プライマーを用い上記 PCR 条件にてハウスキーピング遺伝子 G3PDH の発現を検出することで、予め鋳型 mRNA のコピー数がサンプル間で Normalize（標準化）されていることを確認している。また、ここで、検出された RT-PCR 増幅産物のサイズは、320 bp であり、これは決定した塩基配列から計算されるサイズと一致する。従ってこれらは、マウス NR8 特異的な PCR 増幅反応による産物であると考えられた。このことを更に確認するために、17 日目胚において増幅された PCR 産物を前記 7-2) に従い、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、塩基配列を解析した。その結果マウス NR8 の部分塩基配列であることを認め、非特異的な PCR 増幅による産物である可能性を否定した。

#### 8-2) ノーザンブロッティング法によるマウス NR8 遺伝子の発現様態解析

各マウス臓器における NR8 の遺伝子発現様態の解析と、NR8 転写サイズと同

定を目的として、ノーザンブロッティング法による遺伝子発現解析を試みた。ブロットには Mouse Multiple Tissue Northern Blot (Clontech #7762-1)を使用した。プローブには前記 7-4)にて得られた、5'-RACE 産物のうち mNR8 $\beta$  cDNA 断片を用いた。プローブの調製は、Mega Prime Kit (Amersham, cat#RPN1607)を使用し[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham, cat#AA0005)によってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションには Express Hyb-ridization Solution (Clontech#8015-2)を用い、68°C/30 分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、68°C/ 16 時間のハイブリダイゼーションを実施した。下記の条件にて洗浄をおこなった後、Imaging Plate (FUJI#BAS-III)に露光させ、Image Analyzer (FUJIX, BAS-2000 II)によって、マウス NR8 特異的なシグナルを検出した。

洗浄条件は、(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で 5 分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで 30 分、(3) 0.5x SSC / 0.1% SDS, 50°Cで 30 分である。

その結果、図 19 に示す通り、マウス精巣においてのみ強発現が認められた以外、他の臓器における同遺伝子の発現は検出されなかった。ここで RT-PCR による解析結果とノーザン法による解析結果が異なる検出結果を示すが、ノーザン法の場合、RT-PCR レベルと比較して検出感度がかなり低いため、発現量の低い mRNA を検出することができなかったことが原因であると考えられる。しかし、精巣における遺伝子強発現が検出されたことにより、双方の解析結果の一致が認められる。また、検出された転写産物のサイズは約 4.2 kb であった。

ノーザン法及び RT-PCR 解析法による、各マウス臓器における遺伝子発現状態の解析の結果においては、発現量に偏差はあったものの、特に RT-PCR 法においては解析した全ての臓器で発現が認められるなど、その遺伝子発現は広範な存在分布を示した。これは、免疫担当組織や造血組織、及び特定の白血病細胞株においてのみ強い発現が認められたヒト NR8 遺伝子と比較すると対照的な検出結果であり、その発現状態意義は大変興味深い。このことは即ち、マウスにお

ける NR8 の分子機能が、全身性の造血機能に関与する可能性や、或いは免疫応答、及び造血機能のみならず、多岐にわたる生体の生理調節機構に関与する可能性をも示唆しており、つまり、そのリガンドはホルモン様因子として機能し得る可能性も考えられる。

〔実施例 9〕 プラークスクリーニングによる NR8 マウスゲノム遺伝子の単離

本発明者等は、次に、マウス NR8 遺伝子のゲノム構造の解析を目指し、マウスゲノム DNA ライブラリーに対するプラークハイブリダイゼーションを試みた。ライブラリーとして Lambda FIX II に構築された 129SVJ 株 Genomic DNA (Stratagene#946313) を用いた。約  $5.0 \times 10^5$  プラークのゲノムライブラリーを展開し、Hybond N(+) (Amersham #RPN303B) 付電荷ナイロン膜にブロッティングした後、一次スクリーニングに提供した。プローブには、前記 7-4) にて得られた、5'-RACE 産物の NR8 $\beta$  cDNA 断片を用いた。プローブの調製は前記 8-2) 同様、Mega Prime Kit を用い [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP によってラジオアイソトープ標識した。ハイブリダイゼーションには Express Hyb-ridization Solution を用い、65°C / 30 分のプレハイブリダイゼーションの後、熱変性させた標識プローブを加え、65°C / 16 時間のハイブリダイゼーションを実施した。下記の条件にて洗浄をおこなった後、X 線フィルム (Kodak, cat#165-1512) に露光し、マウス NR8 陽性プラークを検出した。

洗浄条件は、(1) 1x SSC / 0.1% SDS, 室温で 5 分、(2) 1x SSC / 0.1% SDS, 58°C で 30 分、(3) 0.5x SSC / 0.1% SDS, 58°C で 30 分である。

その結果、陽性、或いは疑陽性を示す、独立した 16 クローンが得られた。一次スクリーニングによって得られた、この 16 クローンに対し、同様に二次スクリーニングをおこなった結果、NR8 陽性を示す、独立した 9 クローンのプラークの単離に成功した。

本発明により新規なヘモポエチン受容体蛋白質「NR8」及びそれをコードするDNAが提供された。また、該DNAが挿入されたベクター、該DNAを保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質に結合する天然のリガンドあるいは化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明のNR8蛋白質は、造血作用に関連していると考えられ、造血作用の解析に有用である。また、造血関連疾患の診断や治療への応用が期待される。

マウスNR8遺伝子の発現は、マウス臓器において広範な存在分布を示したことから、マウスNR8蛋白質は、上記造血作用も含めて、多岐にわたる生体の生理調節機構に関与する可能性が存在する。また、マウスNR8蛋白質を用いれば、まず、マウスNR8リガンドを単離し、次いで、マウスNR8リガンドの保存構造を利用してNR8リガンドのヒト相同遺伝子を単離することが可能である。具体的には、マウスNR8リガンドcDNAの塩基配列を決定した後、その配列上にオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、それらを用いヒト由来のcDNAライブラリーを鋳型として交叉PCRを行なうことで、ヒトNR8リガンドcDNAを得ることが可能である。あるいはマウスNR8リガンドcDNAをプローブとして、ヒト由来のcDNAライブラリーに対する交叉ハイブリダイゼーションを行なうことで、ヒトNR8リガンドcDNAを得ることも可能である。また、マウスNR8遺伝子を利用して、マウスNR8遺伝子が欠損したマウスを作成することにより、NR8受容体蛋白質のさらなる生体機能解析を行なうことが可能である。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。
2. 配列番号：3に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：3に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。
3. 配列番号：5に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：5に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。
4. 配列番号：7に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：7に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

5. 配列番号：19示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：19に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

6. 配列番号：21示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：21に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

7. 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

8. 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：3に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

9. 配列番号：6に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：5に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

10. 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、配列番号：7に示す1位のアミノ酸M

e t から 5 3 8 位の アミノ酸 S e r までの アミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

1 1 . 配列番号 : 2 0 に記載の塩基配列からなる D N A とハイブリダイズする D N A がコードする蛋白質であって、配列番号 : 1 9 に示す 1 位の アミノ酸 M e t から 1 4 4 位の アミノ酸 L e u までの アミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

1 2 . 配列番号 : 2 2 に記載の塩基配列からなる D N A とハイブリダイズする D N A がコードする蛋白質であって、配列番号 : 2 1 に示す 1 位の アミノ酸 M e t から 5 3 8 位の アミノ酸 S e r までの アミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

1 3 . 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとからなる融合蛋白質。

1 4 . 請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする D N A 。

1 5 . 請求項 1 4 に記載の D N A が挿入されたベクター。

1 6 . 請求項 1 4 に記載の D N A を発現可能に保持する形質転換体。

1 7 . 請求項 1 6 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造方法。

1 8 . 請求項 1 ~ 1 3 に記載の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

( a ) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、および

( b ) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

1 9 . 請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体。

2 0 . 請求項 1 9 に記載の抗体と、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載

の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、前記抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んでなる該蛋白質の検出又は測定方法。

21. 配列番号：2、4、6、8、20、および22から27のいずれか一つに記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA。



1 / 19

☒ 1

NR8 <sup>#</sup>	40862	<u>SLLPLEFRKDSSYELQVRAGMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEGRCEAGMDTPLL</u>	41032
hTPOR	442	<u>LELRPRSRYLQLRAR-LNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATE</u>	481
hOBR	292	<u>SLLVDSILPGSSYEVQVRGKRLDGP----</u> <u>GIWSDWSTPRVFTIQ</u>	331
hIL2Rb	201	<u>DTQVEFQVRVKPLQGEFT--TWSPWSQPLAFRTK</u>	232
hIL7R	189	<u>TLLQRKLQPAAMYEIKVRS--IPDHYFKGFWEWSPSYYFRTP</u> <u>PEINNSSGEMDPILL</u>	243
hGM-CSFRb	196	<u>TLGPEHLMPSSTYVARVTRLAPGSRLSGRPSKWSP</u> <u>EVWCWDSQ</u>	238
	419	<u>TGYNGIWSEWSEARSWDIES</u>	438
mIL3Rb	200	<u>NLEPKLFLPNSIYAARVTRL</u> <u>SAGSSLGRPSRWSP</u> <u>EVHWSQ</u>	242
	404	<u>QLEPDTSYCARVRVKPI--SDYDGIWSEWSNEYTWTI</u>	438
hIL5Ra	302	<u>SKYDVQVRAAVSSMC</u> <u>REAGLWSEWSQPI</u>	329
hIL9R	241	<u>YTGQWSEWSQPVCFQ</u>	255
hEPOR	211	<u>RGRTRYTFAVRAR-MAEPSFGGFW</u> <u>SAWSEPVSLLTPSD</u>	247
hIL2Rr	209	<u>SLPSVDGQKRYTFRVRSR</u> <u>FNPLCGSAQH--WSEWSHP</u> <u>I</u>	244
hIL12R	197	<u>LCPLEMNVAQEFQLRRRQLG</u> <u>SSGSS-----WSKWSSPV</u>	229
hIL12Rb	282	<u>LDLKPFTYEYEFQISSKL---</u> <u>HLKYGSWSDWSESL</u> <u>RAQTPEE</u>	319

2 / 19

図 2

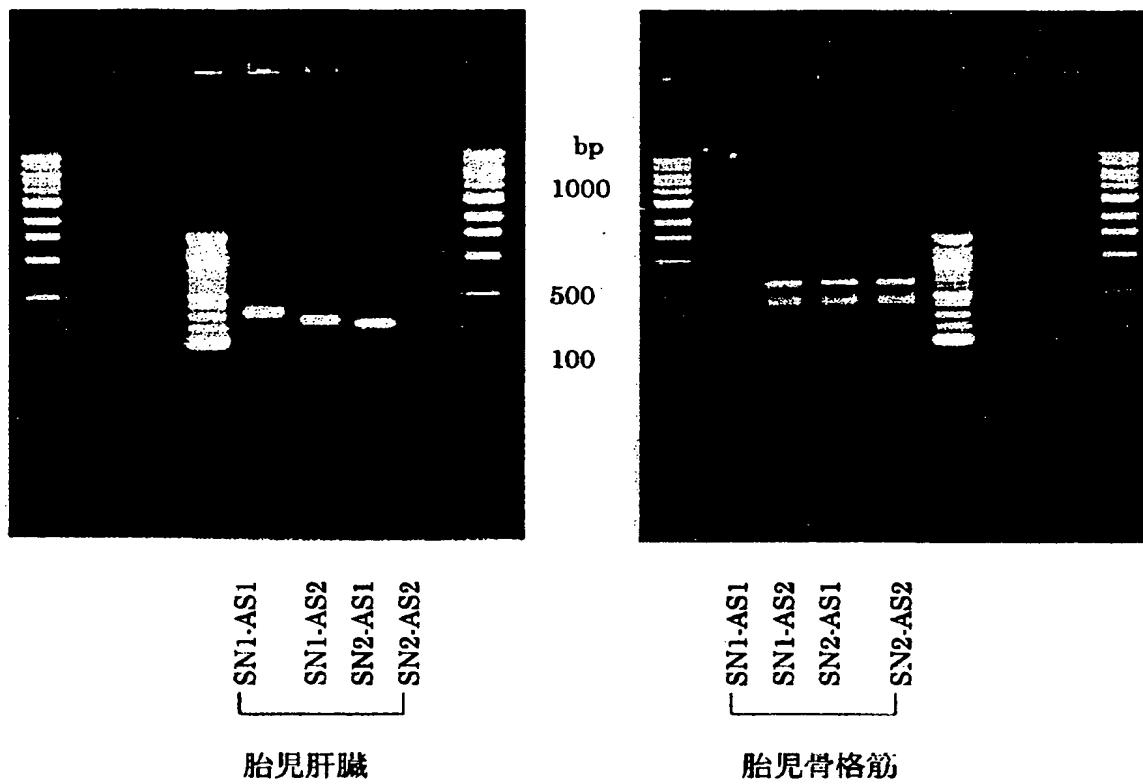
[質問式 (Query) : 39181-39360]

NR8	39233	<u>HQVKPAPPFN</u> -- <u>VTVTFSGQYNISWRS-DYEDP</u> ----- <u>AFYMLKGKLQY</u>	39355
hIL6Ra	214	<u>LQDP</u> <u>PANI</u> -- <u>TVTAVAR-NPRWLSVTWQDP</u> <u>HSWNSSFYRLRFELRY</u>	257
hgp130	218	<u>YKVKNPPHNL</u> -- <u>SVINSEELSSILKLTWT-NPSIKSV</u> -- <u>IILKYNIQY</u>	261
rOBRb	234	<u>VKDP</u> <u>PLGLRMEVTDDGNLKISWDS</u> -QTKAP	263

[質問式 (Query) : 42301-42480]

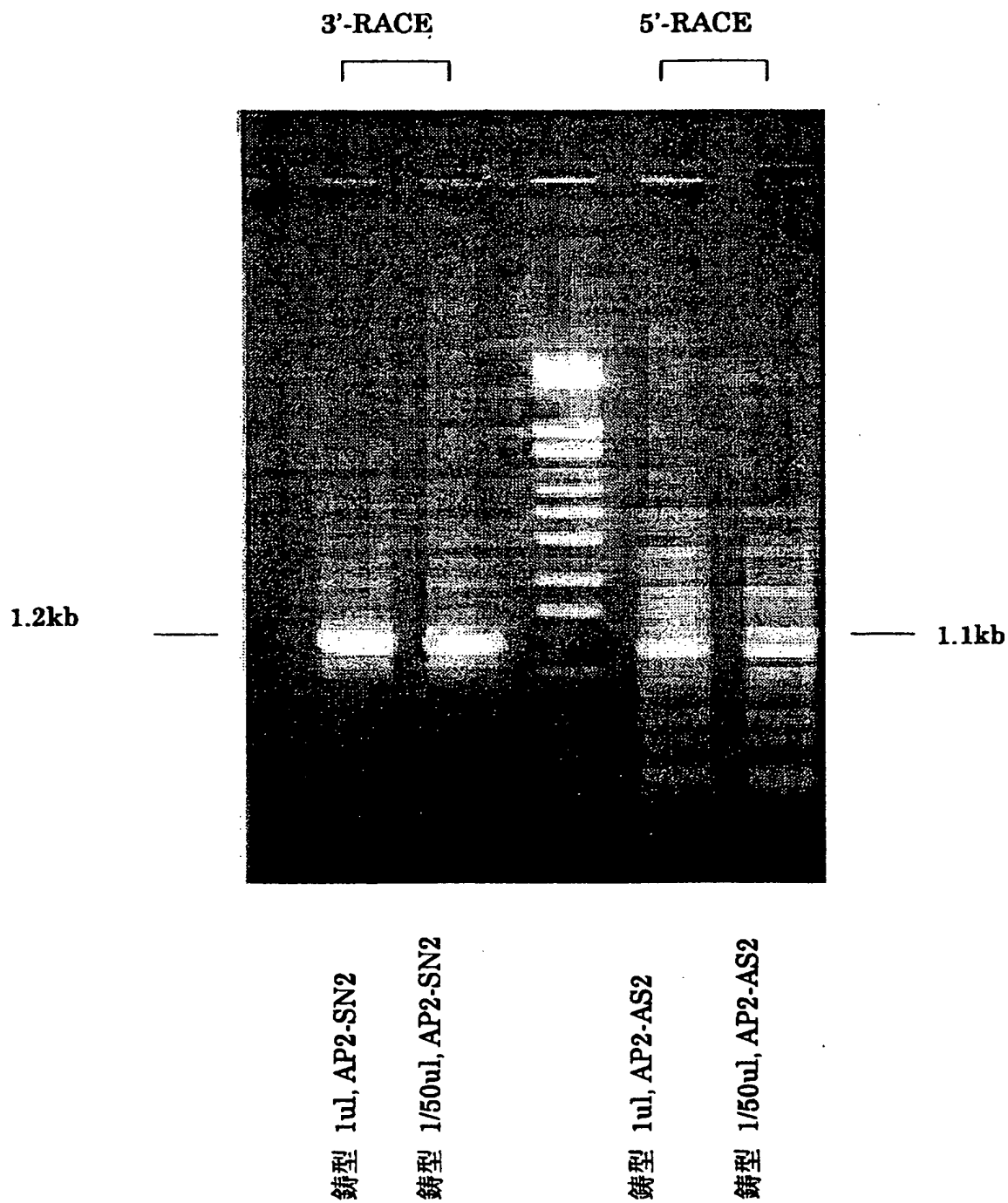
NR8	42307	<u>VPSPERFFMP</u> <u>LYKGCSGDFK</u>	42366
mIL9R	305	<u>IPSPEAFFH</u> <u>PLYSVYHGDFQ</u>	324
hIL9R	305	<u>VPSPAMFFQ</u> <u>PLYSVHNGNFQ</u>	324

図 3



4 / 19

図 4



5 / 19

☒ 5

10 20 30 40 50 60 70 80  
GGCAGCCAGCGGCCTCAGACAGACCCACTGGCGTCTCTCTGCTGAGTGACCGTAAGCTCGGCGTCTGGCCCTCTGCCTGC

90 100 110 120 130 140 150 160  
CTCTCCCTGAGTGTGGCTGACAGCCACGCAGCTGTGTCTGTCTGTCTGCGGCCGTGCATCCCTGCTGCGGCCGCTGGT

170 180 190 200 210 220 230 240  
ACCTTCCTTGCGTCTCTTTCTCTGTCTGCTGCTGTGTGGACACCTGCCTGGAGGCCAGCTGCCCGTCATCAGAGTG

250 260 270 280 290 300 310 320  
ACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGATTCTCACCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACC

330 340 350 360 370 380 390 400  
CTCATCTGTACCCCCACGCTGAACCCAGCTGCCACCCCAGAAGCCCATCAGACTGCCCCCAGCACACGGAATGGATT

410 420 430 440 450 460 470 480  
CTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGCCGTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCTTGCTCCTGTGCTGC  
M P R G W A A P L L L L L L

490 500 510 520 530 540 550 560  
TCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTACCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGG  
Q G G W G C P D L V C Y T D Y L Q T V I C I L E M W

570 580 590 600 610 620 630 640  
AACCTCCACCCAGCAGCTCACCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCCACCTCCTGCAGCCT  
N L H P S T L T L T W Q D Q Y E E L K D E A T S C S L

650 660 670 680 690 700 710 720  
CCACAGGTGCGCCACAATGCCACGCATGCCACCTACACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATT  
H R S A H N A T H A T Y T C H M D V F H F M A D D I F

730 740 750 760 770 780 790 800  
TCAGTGTCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCCAGGAGTGTGGCAGCTTTCTCCTGGCTGAGAGCATCAAGCCG  
S V N I T D Q S G N Y S Q E C G S F L L A E S I K P

810 820 830 840 850 860 870 880  
GCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGACCTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTGCCTT  
A P P F N V T V T F S G Q Y N I S W R S D Y E D P A F

890 900 910 920 930 940 950 960  
CTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAACCGGGAGACCCCTGGGCTGTGAGTCCGAGGAGAA  
Y M L K G K L Q Y E L Q Y R N R G D P W A V S P R R K

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
AGCTGATCTCAGTGGACTCAAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCTCGGAGTTCGCAAAGACTCGAGCTATGAGCTGCAGGTG  
L I S V D S R S V S L L P L E F R K D S S Y E L Q V

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
CGGGCAGGGCCCATGCCTGGCTCCTCCTACCAGGGGACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTCAGACCCAGTC  
R A G P M P G S S Y Q G T W S E W S D P V I F Q T Q S



7 / 19

☒ 7

10 20 30 40 50 60 70 80  
GGCAGCCAGCGGCTCAGACAGACCCACTGGCGTCTCTGCTGAGTGACCGTAAGCTCGGCGTCTGGCCCTCTGCCTGC

90 100 110 120 130 140 150 160  
CTCTCCCTGAGTGTGGCTGACAGCCACGAGCTGTGTCTGTCTGTCTGCGGCCGTGCATCCCTGCTGCGGCCGCTGGT

170 180 190 200 210 220 230 240  
ACCTTCCTTGCCGTCTCTTCTCTGTCTGCTGCTGTGTGGACACCTGCCTGGAGGCCAGCTGCCGTCATCAGAGTG

250 260 270 280 290 300 310 320  
ACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGA CTGGGCTGGGTGTGGATTCTACCCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACC

330 340 350 360 370 380 390 400  
CTCATCTGTACCCCCACGCTGAACCCAGCTGCCACCCCAAGCCATCAGACTGCCCCAGCACACGGAATGGATT

410 420 430 440 450 460 470 480  
CTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGCCCGTGGGAGTCAGCATGCCGCTGGCTGGGCCGCCCTTGTCTCTGCTGCTGC  
M P R G W A A P L L L L L L

490 500 510 520 530 540 550 560  
TCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTACCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGG  
Q G G W G C P D L V C Y T D Y L Q T V I C I L E M W

570 580 590 600 610 620 630 640  
AACCTCCACCCAGCAGCTCACCCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCCACCTCCTGCAGCCT  
N L H P S T L T L T W Q D Q Y E E L K D E A T S C S L

650 660 670 680 690 700 710 720  
CCACAGGTGCGCCACAAATGCCACGCATGCCACCTACACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATTT  
H R S A H N A T H A T Y T C H M D V F H F M A D D I F  
M P R M P P T P A T W M Y S T S W P T T F

730 740 750 760 770 780 790 800  
TCAGTGTCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCAGGAGTGTGGCAGCTTTCTCCTGGCTGAGAGCAAGTCCGAG  
S V N I T D Q S G N Y S Q E C G S F L L A E S K S E  
S V S T S Q T S L A T T P R S V A A F S W L R A S P R

810 820 830 840 850 860 870 880  
GAGAAAGCTGATCTCAGTGGACTCAAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCCCTGGAGTCCGCAAAGACTCGAGCTATGAGCTGC  
E K A D L S G L K K C L P P P P G V P Q R L E L \*

890 900 910 920 930 940 950 960  
R K L I S V D S R S V S L L P L E F R K D S S Y E L Q  
AGGTGCGGGCAGGGCCCATGCCTGGCTCCTCCTACCAGGGGACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTCAGACC

V R A G P M P G S S Y Q G T W S E W S D P V I F Q T

8 / 19

☒ 8

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
CAGTCAGAGGAGTTAAAGGAAGGCTGGAACCCTCACCTGCTGCTTCTCCTCCTGCTTGTTCATAGTCTTCATTCTGCCTT

Q S E E L K E G W N P H L L L L L L L V I V F I P A F  
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
CTGGAGCCTGAAGACCCATCCATTGTGGAGGCTATGGAAGAAGATATGGGCCGTCCCAGCCCTGAGCGGTTCTTCATGC

W S L K T H P L W R L W K K I W A V P S P E R F F M P  
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
CCCTGTACAAGGGCTGCAGCGGAGACTTCAAGAAATGGGTGGGTGCACCCTTCACTGGCTCCAGCCTGGAGCTGGGACCC

L Y K G C S G D F K K W V G A P F T G S S L E L G P  
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280  
TGGAGCCCAGAGGTGCCCTCCACCCTGGAGGTGTACAGCTGCCACCCACCCAGCAGCCCTGTGGAGTGTGACTTCACCAG

W S P E V P S T L E V Y S C H P P S S P V E C D F T S  
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360  
CCCCGGGGACGAAGGACCCCCCGGAGCTACCTCCGCCAGTGGGTGGTCATTCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCC

P G D E G P P R S Y L R Q W V V I P P P L S S P G P Q

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
AGGCCAGCTAATGAGGCTGACTGGATGTCCAGAGCTGGCCAGGCCACTGGGCCCTGAGCCAGAGACAAGGTCACCTGGGC

A S \* \*

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520  
TGTGATGTGAAGACACCTGCAGCCTTTGGTCTCCTGGATGGGCCCTTGAGCCTGATGTTACAGTGTCTGTGTGTGTGTG

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
CATATGTGTGTGTGTCATATGCATGTGTGTGTGTGTGTGTCTTAGGTGCGCAGTGGCATGTCCACGTGTGTGTGATT

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
GCACGTGCCTGTGGGCCTGGGATAATGCCCATGGTACTCCATGCATTACCTGCCCTGTGCATGTCTGGACTCACGGAGC

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760  
TCACCCATGTGCACAAGTGTGCACAGTAAACGTGTTTGTGGTCAACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

1770 1780  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA



9 / 19

☒ 9

10 20 30 40 50 60 70 80  
GGCAGCCAGCGGCCTCAGACAGACCCACTGGCGTCTCTCTGCTGAGTGACCGTAAGCTCGGCGTCTGGCCCTCTGCCTGC

90 100 110 120 130 140 150 160  
CTCTCCCTGAGTGTGGCTGACAGCCACGCAGCTGTGTCTGTCTGTCTGCGGCCCGTGCATCCCTGCTGCGGCCGCTGGT

170 180 190 200 210 220 230 240  
ACCTTCCTTGCCGTCTCTTTCTGTCTGTCTGTCTGTGGGACACCTGCCTGGAGGCCAGCTGCCCGTCATCAGAGTG

250 260 270 280 290 300 310 320  
ACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGATTCTACCCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACC

330 340 350 360 370 380 390 400  
CTCATCTGTCACCCCCAGCTGAACCCAGCTGCCACCCCCAGAAGCCCATCAGACTGCCCCCAGCACACGGAATGGATT

410 420 430 440 450 460 470 480  
CTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGCCCGTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCCCTTGCTCCTGTGCTGC  
M P R G W A A P L L L L L L

490 500 510 520 530 540 550 560  
TCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTACCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGG  
Q G G W G C P D L V C Y T D Y L Q T V I C I L E M W

570 580 590 600 610 620 630 640  
AACCTCCACCCCAGCAGCTCACCCCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCCACCTCCTGCAGCCT  
N L H P S T L T L T W Q D Q Y E E L K D E A T S C S L

650 660 670 680 690 700 710 720  
CCACAGGTGCGCCCAATGCCACGCATGCCACCTACACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGCGCCAGCAGATTT  
H R S A H N A T H A T Y T C H M D V F H F M A D D I F

730 740 750 760 770 780 790 800  
TCAGTGTCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCCAGGAGTGTGGCAGCTTTCTCCTGGCTGAGAGCATCAAGCCG  
S V N I T D Q S G N Y S Q E C G S F L L A E S I K P

810 820 830 840 850 860 870 880  
GCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGACCTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTGCCTT  
A P P F N V T V T F S G Q Y N I S W R S D Y E D P A F

890 900 910 920 930 940 950 960  
CTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAACCGGGGAGACCCCTGGGCTGTGAGTCCGAGGAGAA  
Y M L K G K L Q Y E L Q Y R N R G D P W A V S P R R K

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
AGCTGATCTCAGTGGACTCAAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCCCTGGAGTTCGCAAAGACTCGAGCTATGAGCTGCAGGTG  
L I S V D S R S V S L L P L E F R K D S S Y E L Q V

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120  
CGGGCAGGGCCCATGCCTGGCTCCTCCTACCAGGGGACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTAGACCCAGTC  
R A G P M P G S S Y Q G T W S E W S D P V I F Q T Q S

10 / 19

☒ 10

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
AGAGGAGTTAAAGGAAGGCTGGAACCTCACCTGCTGCTTCTCCTCCTGCTTGTTCATAGTCTTCATTCTGCCTTCTGGA  
E E L K E G W N P H L L L L L L L V I V F I P A F W S  
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280  
GCCTGAAGACCCATCCATTGTGGAGGCTATGGAAGAAGATATGGGCCGTCCCAGCCCTGAGCGGTTCTTCATGCCCTG  
L K T H P L W R L W K K I W A V P S P E R F F M P L  
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360  
TACAAGGGCTGCAGCGGAGACTTCAAGAAATGGGTGGGTGCACCCTTCACTGGCTCCAGCCTGGAGCTGGGACCCTGGAG  
Y K G C S G D F K K W V G A P F T G S S L E L G P W S  
1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
CCCAGAGGTGCCCTCCACCCTGGAGGTGTACAGCTGCCACCCACCAGGAGCCCGCCAAGAGGCTGCAGCTCACGGAGC  
P E V P S T L E V Y S C H P P R S P A K R L Q L T E L  
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520  
TACAAGAACCAGCAGAGCTGGTGGAGTCTGACGGTGTGCCAAGCCCAGCTTCTGGCCGACAGCCAGAAGCTCGGGGGGC  
Q E P A E L V E S D G V P K P S F W P T A Q N S G G

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
TCAGCTTACAGTGAGGAGAGGGATCGGCCATACGGCCTGGTGTCCATTGACACAGTGACTGTGCTAGATGCAGAGGGGCC  
S A Y S E E R D R P Y G L V S I D T V T V L D A E G P

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
ATGCACCTGGCCCTGCAGCTGTGAGGATGACGGCTACCCAGCCCTGGACCTGGATGCTGGCCTGGAGCCAGCCAGGCC  
C T W P C S C E D D G Y P A L D L D A G L E P S P G L

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760  
TAGAGGACCCACTCTTGGATGCAGGGACCACAGTCTGTCTGTGGCTGTGTCTCAGCTGGCAGCCCTGGGCTAGGAGGG  
E D P L L D A G T T V L S C G C V S A G S P G L G G

1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840  
CCCCTGGGAAGCCTCCTGGACAGACTAAAGCCACCCCTTGCAGATGGGGAGGACTGGGCTGGGGGACTGCCCTGGGGTGG  
P L G S L L D R L K P P L A D G E D W A G G L P W G G

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920  
CCGGTCACCTGGAGGGGTCTCAGAGAGTGAGGCGGGCTACCCCTGGCCGGCCTGGATATGGACAGTTTGACAGTGGCT  
R S P G G V S E S E A G S P L A G L D M D T F D S G F

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000  
TTGTGGGCTCTGACTGCAGCAGCCCTGTGGAGTGTGACTTCACCAGCCCCGGGGACGAAGGACCCCCGGAGCTACCTC  
V G S D C S S P V E C D F T S P G D E G P P R S Y L

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080  
CGCCAGTGGGTGGTCAATCCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCAGGCCAGCTAATGAGGCTGACTGGATGTCCAGAG  
R Q W V V I P P L S S P G P Q A S \* \*

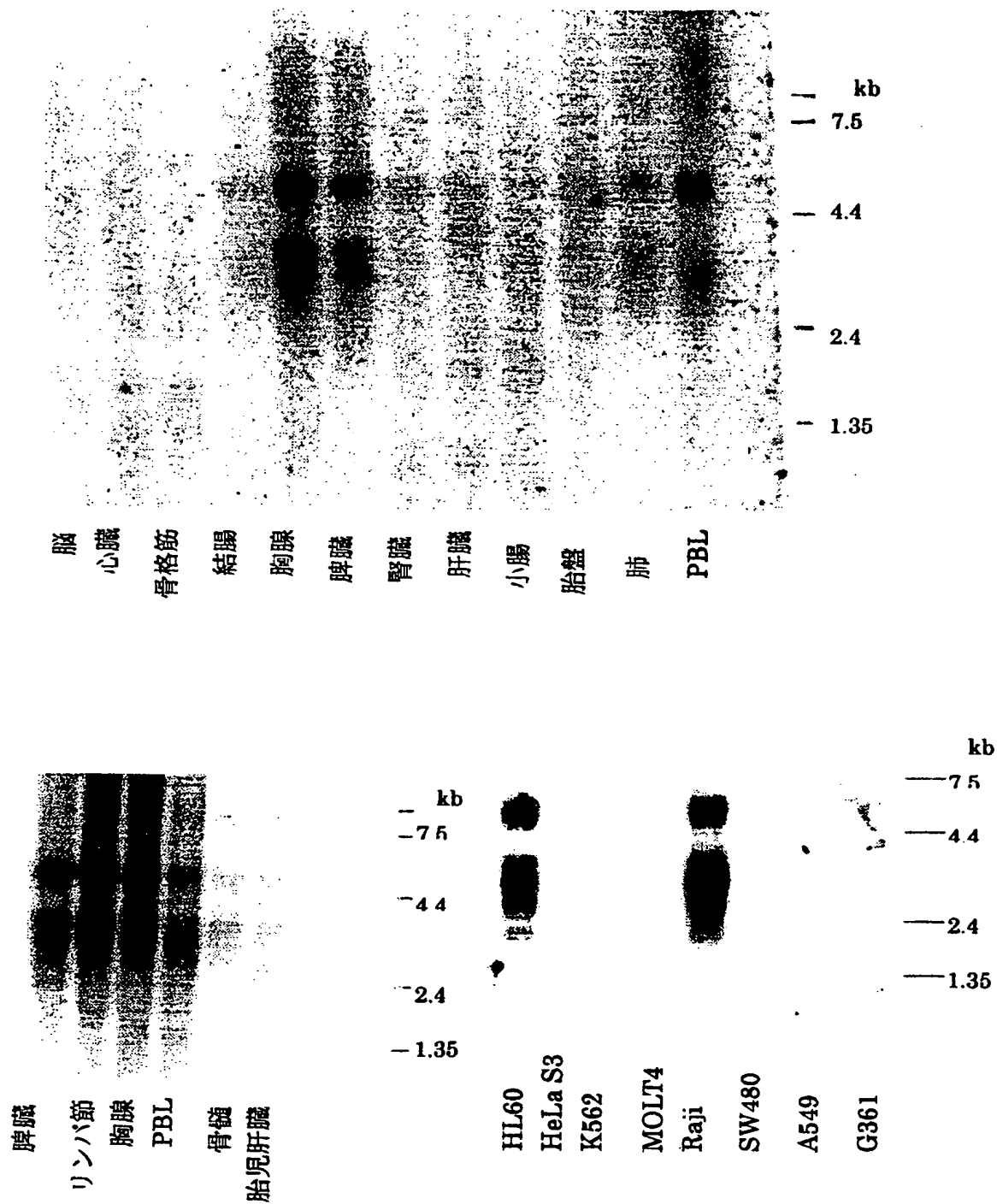
1 1 / 1 9

图 1 1

2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
CTGGCCAGGCCACTGGGCCCTGAGCCAGAGACAAGGTCACCTGGGCTGTGATGTGAAGACACCTGCAGCCTTTGGTCTCC							
2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240
TGGATGGGCCTTTGAGCCTGATGTTTACAGTGTCTGTGTGTGTGCATATGTGTGTGTGCATATGCATGTGTGTGTG							
2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320
TGTGTGTGTCTTAGGTGCGCAGTGGCATGTCCACGTGTGTGTGATTGCACGTGCCTGTGGGCCTGGGATAATGCCCATGG							
2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
TACTCCATGCATTACCTGCCCTGTGCATGTCTGGACTCACGGAGCTCACCCATGTGCACAAGTGTGCACAGTAAACGTG							
2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480
TTTGTGGTCAACAGAA							

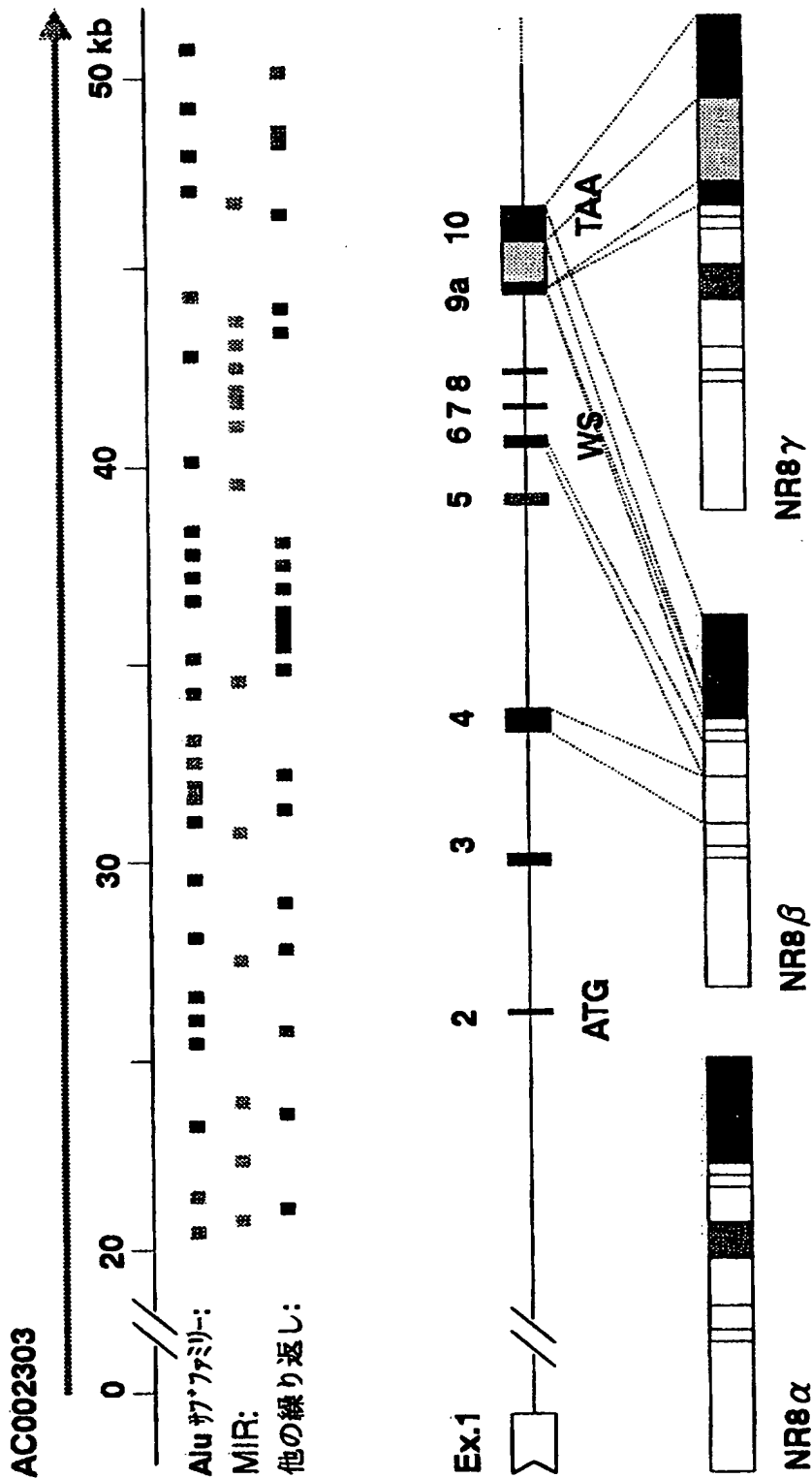
12 / 19

図 12



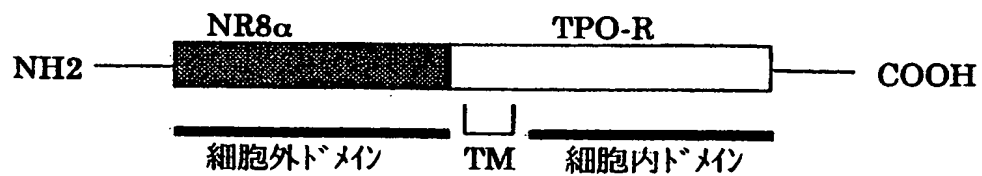
13 / 19

図 13



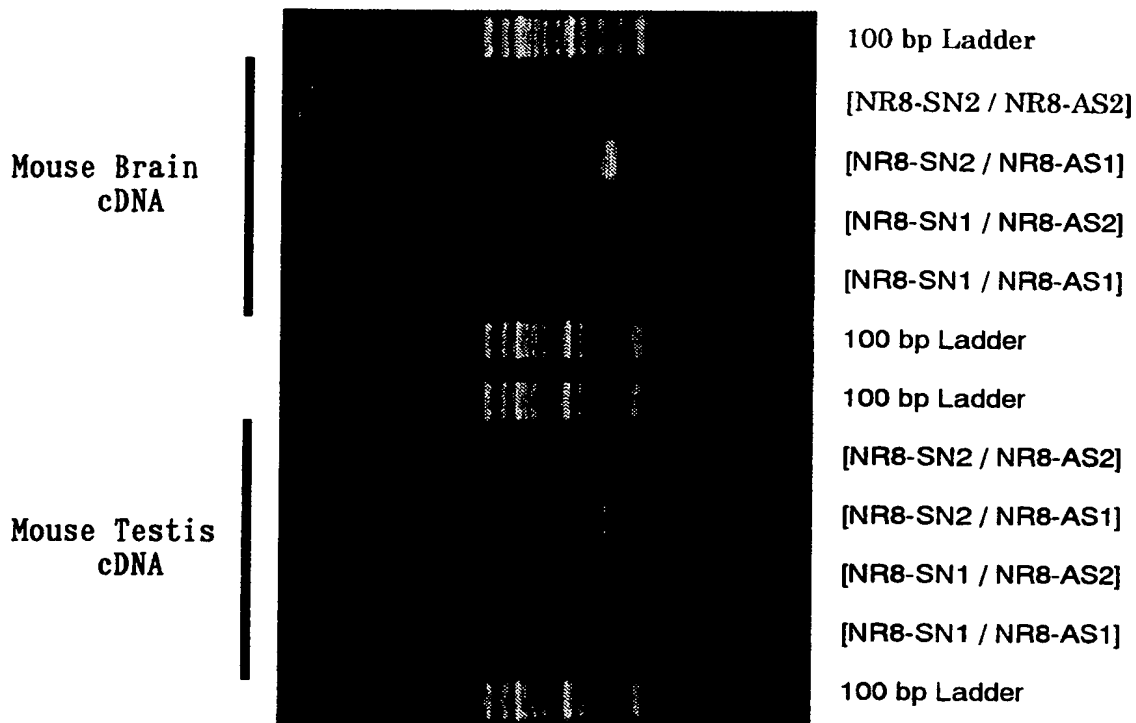
14 / 19

図 14

**pEF-NR8/TPO-R****pEF-NR8/IgG-Fc****pEF-BOS/NR8h FLAG**

15 / 19

15



16 / 19

☒ 16

<b>hNR8BETA</b>	<b>MPRGWAAPLL</b>	<b>LLLLQGGWGC</b>	<b>PDLVCYTDYL</b>	<b>QTVICILEMW</b>	<b>40</b>
<b>mNR8BETA</b>	<b>MPRGWAASLL</b>	<b>LLLLQGGWGC</b>	<b>PDLVCYTDYL</b>	<b>QTVICILEMW</b>	<b>40</b>
<b>hNR8BETA</b>	<b>NLHPSTLTLT</b>	<b>WQDQYEELKD</b>	<b>EATSCSLHRS</b>	<b>AHNATHATYT</b>	<b>80</b>
<b>mNR8BETA</b>	<b>NLHPSTLTLT</b>	<b>WQDQYEELKD</b>	<b>EATSCSLHRS</b>	<b>AHNATHATYT</b>	<b>80</b>
<b>hNR8BETA</b>	<b>CHMDVFHFMA</b>	<b>DDIFSVNITD</b>	<b>QSGNYSQECG</b>	<b>SFLLAESKSE</b>	<b>120</b>
<b>mNR8BETA</b>	<b>SHMDVFHFMA</b>	<b>DDIFSVNITD</b>	<b>QSGNYFOECG</b>	<b>SFLRAESKSE</b>	<b>120</b>
<b>hNR8BETA</b>	<b>EKADESGLKK</b>	<b>CLPPPPGVPO</b>	<b>RLEL</b>		<b>144</b>
<b>mNR8BETA</b>	<b>EKADESGLKK</b>	<b>CLPPPPGVPO</b>	<b>RLEL</b>		<b>144</b>



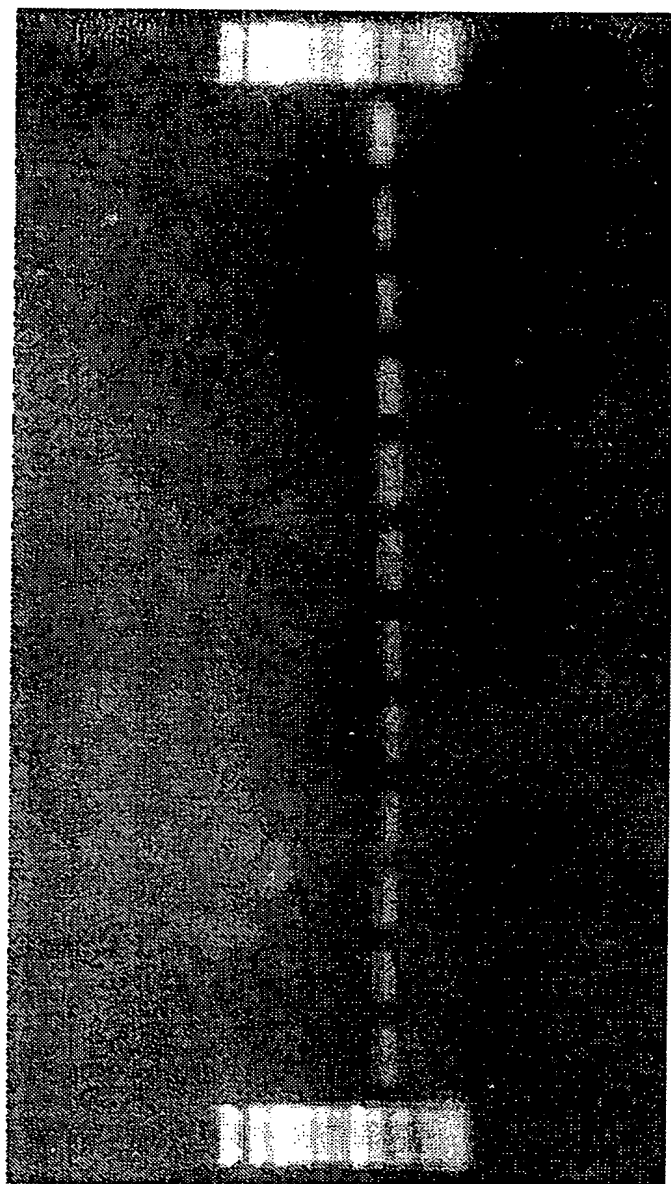
17 / 19

図 17

hNR8G	MPRGWAAPLL	LLLLQGGWGC	PDLVCYTDYL	QTVICILEMW	40
mNR8G	MPRGWAASLL	LLLLQGGWGC	PDLVCYTDYL	QTVICILEMW	40
hNR8G	NLHPSTLTLT	WQDQYEELKD	EATSCSLHRS	AHNATHATYT	80
mNR8G	NLHPSTLTLT	WQDQYEELKD	EATSCSLHRS	AHNATHATYT	80
hNR8G	CHMDVFHFMA	DDIFSVNITD	QSGNYSQECG	SFLLAESTKP	120
mNR8G	SHMDVEHFMA	DDIFSVNITD	QSGNYFQECG	SFLRAESTKP	120
hNR8G	APPFNVTVTF	SGQYNISWRS	DYEDPAFYML	KGKLOYELOV	160
mNR8G	APPFNVTVTF	SGQYNISRRS	DYEDPAFYML	KGKLOYELOV	160
hNR8G	RNRGDPWAVS	PRRKLISVDS	RSVSLLPLEF	RKDSSYELOV	200
mNR8G	RNRGDPWAVS	PRRKLISVDS	RSVSLLPLEF	RKDSSYELOV	200
hNR8G	RAGPMPGSSY	QGTWSEWSDP	VIFQTOSEEL	KEGWNPHLLL	240
mNR8G	RAGPMPGSSY	QGTWSEWSDP	VIFQTOSEEL	KEGWNPHLLL	240
hNR8G	LLLLVIVFIP	AFWSLKTHPL	WRLWKKIWAV	PSPERFFMPL	280
mNR8G	LLLLVIVFIP	AFWSLKTHPL	WRLWKKIWAV	PSPERFFMPL	280
hNR8G	YKGCSGDFKK	WVGAPFTGSS	LELGPWSPEV	PSTLEVYSCH	320
mNR8G	YKGCSGDFKK	WVGAPFTGSS	LELGPWSPEV	PSTLEVYSCH	320
hNR8G	PPRSPAKRLQ	LTELQEPael	VESDGVPKPS	FWPTAQNSGG	360
mNR8G	PPRSPAKRLQ	LTELQEPael	VESDGVPKPS	FWPTAQNSGG	360
hNR8G	SAYSEERDRP	YGLVSIIDTVT	VLDAEGPCTW	PCSCEDDGYP	400
mNR8G	SAYSEERDRP	YGLVSIIDTVT	VLDAEGPCTW	PCSCEDDGYP	400
hNR8G	ALDLDAGLEP	SPGLEDPILL	AGTTVLSCGC	VSAGSPGLGG	440
mNR8G	ALDLDAGLEP	SPGLEDPILL	AGTTVLSCGC	VSAGSPGLGG	440
hNR8G	PLGSLIDRLK	PPLADGEDWA	GGLPWGGRSP	GGVSESEAGS	480
mNR8G	PLGSLIDRLK	PPLADGEDWA	GGLPWGGRSP	GGVSESEAGS	480
hNR8G	PLAGLDMDTF	DSGFVCSDCS	SPVECDFTSP	GDEGPFRSYL	520
mNR8G	PLAGLDMDTF	DSGFVCSDCS	SPVECDFTSP	GDEGPFRSYL	520
hNR8G	RQWVVIPIPL	SSPGPOAS			538
mNR8G	RQWVVIPIPL	SSPGPOAS			538

18 / 19

図 18



100 bp Ladder

E17-day

E15-day

E11-day

E7-day

精巢

腎臓

骨格筋

肝臓

肺

脾臓

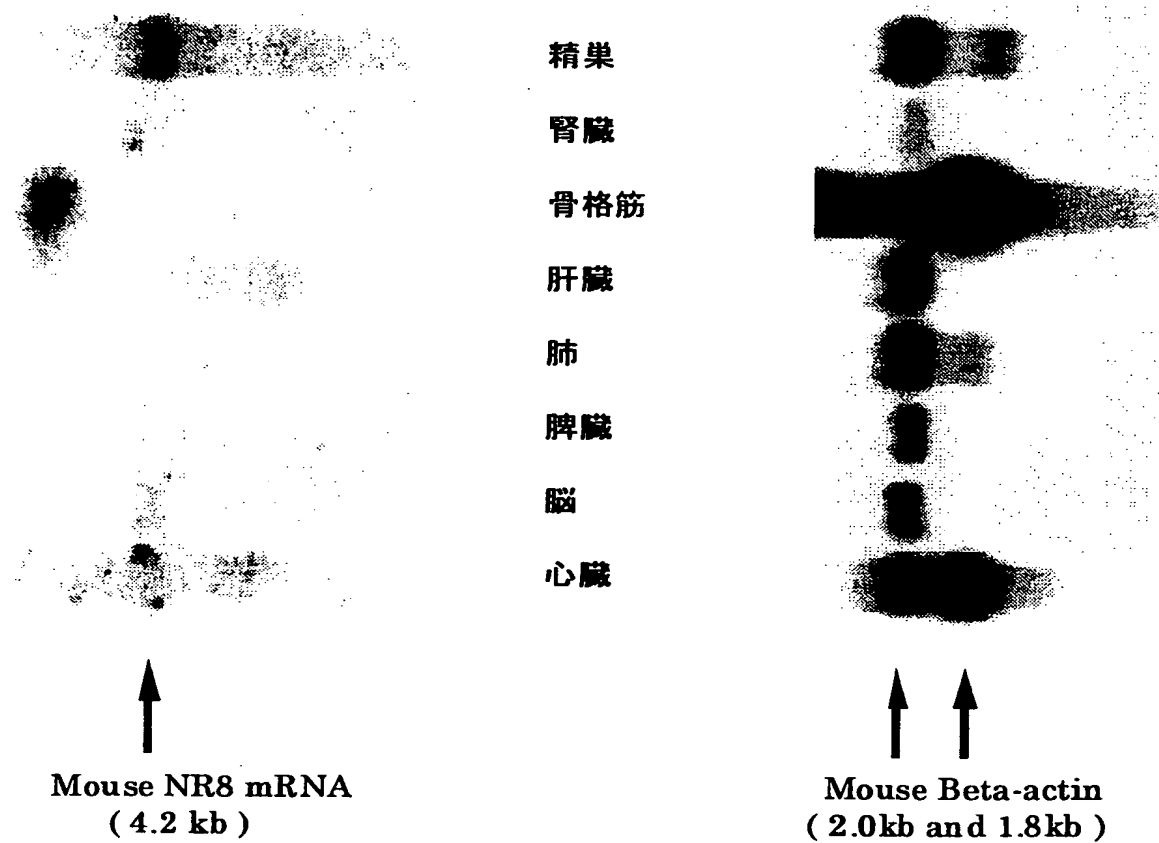
脳

心臓

100 bp Ladder

19 / 19

図 19



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社中外分子医学研究所

<120> NOVEL HEMOPOIETIN RECEPTOR PROTEIN

新規ヘモポエチン受容体蛋白質

<130> C2-004PCT

<150> JP 10-214720

<151> 1998-6-24

<160> 30

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 361

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu  
1 5 10

Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr  
15 20 25

Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His  
30 35 40

Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys  
45 50 55

Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr  
60 65 70 75

His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp  
80 85 90

Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln  
95 100 105

Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro  
110 115 120

Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg  
125 130 135

Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln

140

145

150

155

Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro

160

165

170

Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro

175

180

185

Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly

190

195

200

Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp

205

210

215

Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn

220

225

230

235

Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala

240

245

250

Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile

255

260

265

Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly

270 275 280

Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser  
285 290 295

Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu  
300 305 310 315

Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr  
320 325 330

Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val  
335 340 345

Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser  
350 355 360

<210> 2

<211> 1884

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (441)..(1523)

&lt;400&gt; 2

ggcagccagc ggcctcagac agaccactg gcgtctctct gctgagtgac cgtaagctcg 60

gcgtctggcc ctctgcctgc ctctccctga gtgtggctga cagccacgca gctgtgtctg 120

tctgtctgcg gcccgatgc cctgctgcg gccgcctggc accttccttg ccgtctcttt 180

cctctgtctg ctgctctgtg ggacacctgc ctggaggccc agctgcccgat catcagagtg 240

acaggtctta tgacagcctg attggtgact cgggctgggt gtggattctc acccaggcc 300

tctgcctgct ttctcagacc ctcatctgtc acccccacgc tgaaccacgc tgccaccccc 360

agaagcccat cagactgccc ccagcacacg gaatggattt ctgagaaaga agccgaaaca 420

gaaggcccgat gggagtcagc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg 473

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu

1

5

10

ctg ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc 521

Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr

15

20

25

gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac 569

Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His



30	35	40	
ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag 617			
Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys			
45	50	55	
gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tgc gcc cac aat gcc acg 665			
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr			
60	65	70	75
cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac 713			
His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp			
80	85	90	
gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag 761			
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln			
95	100	105	
gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct 809			
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro			
110	115	120	
ttc aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc 857			
Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg			
125	130	135	

tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag 905

Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln

140

145

150

155

tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg 953

Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro

160

165

170

agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc 1001

Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro

175

180

185

ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg 1049

Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly

190

195

200

ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac 1097

Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp

205

210

215

ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac 1145

Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn

220

225

230

235

cct cac ctg ctg ctt ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc 1193

Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala

240	245	250	
ttc tgg agc ctg aag acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata			1241
Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile			
255	260	265	
tgg gcc gtc ccc agc cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc			1289
Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly			
270	275	280	
tgc agc gga gac ttc aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc			1337
Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser			
285	290	295	
agc ctg gag ctg gga ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag			1385
Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu			
300	305	310	315
gtg tac agc tgc cac cca ccc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc			1433
Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr			
320	325	330	
agc ccc ggg gac gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg			1481
Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val			
335	340	345	

gtc att cct ccg cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc taa 1526

Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

350

355

360

tgaggctgac tggatgtcca gagctggcca ggccactggg ccctgagcca gagacaaggt 1586

cacctgggct gtgatgtgaa gacacctgca gcctttggtc tcctggatgg gcctttgagc 1646

ctgatgttta cagtgtctgt gtgtgtgtgc atatgtgtgt gtgtgcatat gcatgtgtgt 1706

gtgtgtgtgt gtcttaggtg cgcagtggca tgtccacgtg tgtgtgattg cacgtgcctg 1766

tgggcctggg ataatgccca tggtaactcca tgcattcacc tgccctgtgc atgtctggac 1826

tcacggagct cacccatgtg cacaagtgtg cacagtaaac gtgtttgtgg tcaacaga 1884

<210> 3

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu

1

5

10

Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr

15

20

25

Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His

30

35

40

Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys

45

50

55

Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr

60

65

70

75

His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp

80

85

90

Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln

95

100

105

Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala

110

115

120

Asp Leu Ser Gly Leu Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro

125

130

135

Gln Arg Leu Glu Leu

140

<210> 4

<211> 1729

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (441)..(872)

<400> 4

ggcagccagc ggcctcagac agaccactg gcgtctctct gctgagtgac cgtaagctcg 60

gcgtctggcc ctctgcctgc ctctccctga gtgtggctga cagccacgca gctgtgtctg 120

tctgtctgcg gcccgat cctgctgcg gccgcctgg accttccttg ccgtctcttt 180

cctctgtctg ctgctctgtg ggacacctgc ctggaggccc agctgcccg catcagagt 240

acaggtctta tgacagcctg attggtgact cgggctgggt gtggattctc accccaggcc 300

tctgcctgct ttctcagacc ctcatctgtc accccaagc tgaaccagc tgccaccccc 360

agaagcccat cagactgccc ccagcacacg gaatggattt ctgagaaaga agccgaaaca 420

gaaggcccggt gggagtcagc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg 473

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu

1

5

10

ctg ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc 521

Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr

15

20

25

gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac 569

Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His

30

35

40

ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag 617

Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys

45

50

55

GAC GAG GCC ACC TCC TGC AGC CTC CAC AGG TCG GCC CAC AAT GCC ACG 665

Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr

60

65

70

75

CAT GCC ACC TAC ACC TGC CAC ATG GAT GTA TTC CAC TTC ATG GCC GAC 713

His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp

80

85

90

GAC ATT TTC AGT GTC AAC ATC ACA GAC CAG TCT GGC AAC TAC TCC CAG 761

Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln

95	100	105	
GAG TGT GGC AGC TTT CTC CTG GCT GAG AGC AAG TCC GAG GAG AAA GCT			809
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala			
110	115	120	
gat ctc agt gga ctc aag aag tgt ctc cct cct ccc cct gga gtt ccg			857
Asp Leu Ser Gly Leu Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro			
125	130	135	
caa aga ctc gag cta tgagctgcag gtgcgggcag ggcccatgcc tggctcctcc			912
Gln Arg Leu Glu Leu			
140			
taccagggga cctggagtga atggagtgac ccggtcatct ttcagacca gtcagaggag			972
ttaaaggaag gctggaaccc tcacctgctg cttctcctcc tgccttgcat agtcttcatt			1032
cctgccttct ggagcctgaa gacccatcca ttgtggaggc tatggaagaa gatatgggcc			1092
gtccccagcc ctgagcggtt cttcatgccc ctgtacaagg gctgcagcgg agacttcaag			1152
aaatgggtgg gtgcaccctt cactggctcc agcctggagc tgggaccctg gagcccagag			1212
gtgcctcca ccctggaggt gtacagctgc caccaccca gcagccctgt ggagtgtgac			1272



ttcaccagcc cgggggacga aggaccccc cggagctacc tccgccagtg ggtggtcatt 1332

cctccgccac tttcgagccc tggaccccag gccagctaata gaggtgact ggatgtccag 1392

agctggccag gccactgggc cctgagccag agacaaggtc acctgggctg tgatgtgaag 1452

acacctgcag cctttggtct cctggatggg cctttgagcc tgatgtttac agtgtctgtg 1512

tgtgtgtgca tatgtgtgtg tgtgcatatg catgtgtgtg tgtgtgtgtg tcttaggtgc 1572

gcagtggcat gtccacgtgt gtgtgattgc acgtgcctgt gggcctggga taatgccat 1632

ggtactccat gcattcacct gccctgtgca tgtctggact cacggagctc acctatgtgc 1692

acaagtgtgc acagtaaagc tgtttgttgt caacaga

1729

<210> 5

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Pro Arg Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Trp Met Tyr Ser Thr Ser

1

5

10

15

Trp Pro Thr Thr Phe Ser Val Ser Thr Ser Gln Thr Ser Leu Ala Thr

20

25

30

Thr Pro Arg Ser Val Ala Ala Phe Ser Trp Leu Arg Ala Ser Pro Arg

35

40

45

Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu

50

55

60

Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro

65

70

75

80

Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro

85

90

95

Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro

100

105

110

His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe

115

120

125

Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp

130

135

140

Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys

145                      150                      155                      160

Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser

                         165                      170                      175

Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val

                         180                      185                      190

Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser

                         195                      200                      205

Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val

                         210                      215                      220

Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

225                      230                      235

<210> 6

<211> 1729

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (659)..(1368)

&lt;400&gt; 6

ggcagccagc ggcctcagac agaccactg ggtctctct gctgagtgac cgtaagctcg	60
ggtcttgccc ctctgcctgc ctctccctga gtgtggctga cagccacgca gctgtgtctg	120
tctgtctgcg gcccgtgcat cctgctgcg gccgcctggt accttccttg ccgtctcttt	180
cctctgtctg ctgctctgtg ggacacctgc ctggaggccc agctgcccg catcagagt	240
acaggtctta tgacagcctg attggtgact cgggctgggt gtggattctc acccaggcc	300
tctgcctgct ttctcagacc ctcatctgtc accccaagc tgaaccacg tgcaccccc	360
agaagcccat cagactgccc ccagcacag gaatggattt ctgagaaaga agccgaaaca	420
gaaggcccg gggagtcagc atgccgcgtg gctgggcgc ccccttgctc ctgctgctgc	480
tccagggagg ctggggctgc cccgacctg tctgtacac cgattacctc cagacggtca	540
tctgcatcct ggaaatgtgg aacctccacc ccagcacgt cacccttacc tggcaagacc	600
agtatgaaga gctgaaggac gaggccacct cctgcagcct ccacaggtcg gccacaa	658
atg cca cgc atg cca cct aca cct gcc aca tgg atg tat tcc act tca	705
Met Pro Arg Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Trp Met Tyr Ser Thr Ser	

1	5	10	15	
tgg ccg acg aca ttt tca gtg tca aca tca cag acc agt ctg gca act				753
Trp Pro Thr Thr Phe Ser Val Ser Thr Ser Gln Thr Ser Leu Ala Thr				
	20	25	30	
act ccc agg agt gtg gca gct ttc tcc tgg ctg aga gca agt ccg agg				801
Thr Pro Arg Ser Val Ala Ala Phe Ser Trp Leu Arg Ala Ser Pro Arg				
	35	40	45	
aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg				849
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu				
	50	55	60	
gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc				897
Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro				
65	70	75	80	
atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg				945
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro				
	85	90	95	
gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct				993
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro				
	100	105	110	

cac ctg ctg ctt ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc ttc 1041  
His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe  
115 120 125

tgg agc ctg aag acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata tgg 1089  
Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp  
130 135 140

gcc gtc ccc agc cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc tgc 1137  
Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys  
145 150 155 160

agc gga gac ttc aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc agc 1185  
Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser  
165 170 175

ctg gag ctg gga ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag gtg 1233  
Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val  
180 185 190

tac agc tgc cac cca ccc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc agc 1281  
Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser  
195 200 205

ccc ggg gac gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg gtc 1329  
Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val

210	215	220	
att cct ccg cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc taatgaggct			1378
Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser			
225	230	235	
gactggatgt ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagagacaa ggtcacctgg			1438
gctgtgatgt gaagacacct gcagcctttg gtctcctgga tgggcctttg agcctgatgt			1498
ttacagtgtc tgttgtgtg tgcataatgt tgttgtgtgca tatgcatgtg tgttgtgtg			1558
tgtgtcttag gtgcgcagtg gcatgtccac gtgttgtgtga ttgcacgtgc ctgtgggcct			1618
gggataatgc ccatggtact ccatgcattc acctgccctg tgcattgtctg gactcacgga			1678
gctcacccat gtgcacaagt gtgcacagta aacgtgtttg tgggtcaacaga			1729

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 538

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu

	1	5	10
Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr			
15	20	25	
Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His			
30	35	40	
Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys			
45	50	55	
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr			
60	65	70	75
His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp			
80	85	90	
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln			
95	100	105	
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro			
110	115	120	
Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg			
125	130	135	



Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln  
140 145 150 155

Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro  
160 165 170

Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro  
175 180 185

Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly  
190 195 200

Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp  
205 210 215

Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn  
220 225 230 235

Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala  
240 245 250

Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile  
255 260 265

Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly  
270 275 280

Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser

285

290

295

Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu

300

305

310

315

Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu

320

325

330

Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro

335

340

345

Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr

350

355

360

Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val

365

370

375

Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu

380

385

390

395

Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser

400

405

410

Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser

415 420 425  
Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly  
430 435 440  
Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp  
445 450 455  
Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu  
460 465 470 475  
Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp  
480 485 490  
Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe  
495 500 505  
Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp  
510 515 520  
Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser  
525 530 535

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 2415

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (441)..(2054)

&lt;400&gt; 8

ggcagccagc ggcctcagac agaccactg gcgtctctct gctgagtgac cgtaagctcg 60

gcgtctggcc ctctgcctgc ctctccctga gtgtggctga cagccacgca gctgtgtctg 120

tctgtctgcg gcccgatgc cctgctgcg gccgcctggc accttccttg ccgtctcttt 180

cctctgtctg ctgtctgtg ggacacctgc ctggaggccc agctgcccg catcagagtg 240

acaggtctta tgacagcctg attggtgact cgggctgggt gtggattctc accccaggcc 300

tctgcctgct ttctcagacc ctcatctgtc acccccacgc tgaaccagc tgccaccccc 360

agaagcccat cagactgccc ccagcacacg gaatggattt ctgagaaaga agccgaaaca 420

gaaggcccg gggagtcagc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg 473

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu

1

5

10

ctg ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc 521  
Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr  
15 20 25

gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac 569  
Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His  
30 35 40

ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag 617  
Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys  
45 50 55

gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg 665  
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr  
60 65 70 75

cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac 713  
His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp  
80 85 90

gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag 761  
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln  
95 100 105

gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct 809  
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro

110	115	120	
ttc aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc			857
Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg			
125	130	135	
tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag			905
Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln			
140	145	150	155
tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg			953
Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro			
160	165	170	
agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc			1001
Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro			
175	180	185	
ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg			1049
Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly			
190	195	200	
ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac			1097
Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp			
205	210	215	

ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac 1145

Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn

220

225

230

235

cct cac ctg ctg ctt ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc 1193

Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala

240

245

250

ttc tgg agc ctg aag acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata 1241

Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile

255

260

265

tgg gcc gtc ccc agc cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc 1289

Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly

270

275

280

tgc agc gga gac ttc aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc 1337

Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser

285

290

295

agc ctg gag ctg gga ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag 1385

Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu

300

305

310

315

gtg tac agc tgc cac cca cca cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc 1433

Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu

	320	325	330	
acg gag cta caa gaa cca gca gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc				1481
Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro				
	335	340	345	
aag ccc agc ttc tgg ccg aca gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac				1529
Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr				
	350	355	360	
agt gag gag agg gat cgg cca tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg				1577
Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val				
	365	370	375	
act gtg cta gat gca gag ggg cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag				1625
Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu				
	380	385	390	395
gat gac ggc tac cca gcc ctg gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc				1673
Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser				
	400	405	410	
cca ggc cta gag gac cca ctc ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc				1721
Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser				
	415	420	425	



tgt ggc tgt gtc tca gct ggc agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga 1769  
Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly  
430 435 440

agc ctc ctg gac aga cta aag cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg 1817  
Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp  
445 450 455

gct ggg gga ctg ccc tgg ggt ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag 1865  
Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu  
460 465 470 475

agt gag gcg ggc tca ccc ctg gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac 1913  
Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp  
480 485 490

agt ggc ttt gtg ggc tct gac tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc 1961  
Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe  
495 500 505

acc agc ccc ggg gac gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg 2009  
Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp  
510 515 520

gtg gtc att cct ccg cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc taa 2057  
Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

525

530

535

tgaggctgac tggatgtcca gagctggcca ggccactggg ccctgagcca gagacaaggt 2117

cacctgggct gtgatgtgaa gacacctgca gcctttggtc tcctggatgg gcctttgagc 2177

ctgatgttta cagtgtctgt gtgtgtgtgc atatgtgtgt gtgtgcatat gcatgtgtgt 2237

gtgtgtgtgt gtcttaggtg cgcagtggca tgtccacgtg tgtgtgattg cacgtgcctg 2297

tgggcctggg ataatgccc tggtactcca tgcattcacc tgccctgtgc atgtctggac 2357

tcacggagct cacccatgtg cacaagtgtg cacagtaaac gtgtttgtgg tcaacaga 2415

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 9

ccggctcccc ctttcaacgt gactgtgacc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ggcaagcttc agtatgagct gcagtacagg

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 11

accctctgac tgggtctgaa agatgaccgg

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 12

catgggccct gccgcacct gcagtcata

30

<210> 13

<211> 1128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<400> 13

atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga 48

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg 96

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc 144

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc 192

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50

55

60

tgc agc ctc cac agg tgc gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc 240

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr

65

70

75

80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc 288

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

85

90

95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt 336

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe

100

105

110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg 384

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val

115

120

125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac 432  
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp  
130 135 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac 480  
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr  
145 150 155 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc 528  
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile  
165 170 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa 576  
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys  
180 185 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc 624  
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser  
195 200 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag 672  
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln  
210 215 220

acc cag tca gag acc gcc tgg atc tcc ttg gtg acc gct ctg cat cta 720

Thr Gln Ser Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr Ala Leu His Leu  
225 230 235 240

gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc ctg ctg ctg ctg agg tgg cag 768  
Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln  
245 250 255

ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg cat gcc ctg tgg ccc tca ctt 816  
Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu Trp Pro Ser Leu  
260 265 270

cca gac ctg cac cgg gtc cta ggc cag tac ctt agg gac act gca gcc 864  
Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala  
275 280 285

ctg agc ccg ccc aag gcc aca gtc tca gat acc tgt gaa gaa gtg gaa 912  
Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu  
290 295 300

ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag tcc tca gag agg act cct ttg 960  
Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu  
305 310 315 320

ccc ctg tgt tcc tcc cag gcc cag atg gac tac cga aga ttg cag cct 1008  
Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro  
325 330 335

tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct gtg tgc cca ccc atg gct gag 1056  
Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro Pro Met Ala Glu  
340 345 350

tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att gcc aac cat tcc tac cta cca 1104  
Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro  
355 360 365

cta agc tat tgg cag cag cct tga 1128  
Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro  
370 375

<210> 14

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1 5 10 15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20 25 30



Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50

55

60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr

65

70

75

80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

85

90

95

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe

100

105

110

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val

115

120

125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp

130

135

140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr

145

150

155

160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile

165

170

175

Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys

180

185

190

Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser

195

200

205

Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln

210

215

220

Thr Gln Ser Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr Ala Leu His Leu

225

230

235

240

Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln

245

250

255

Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu Trp Pro Ser Leu

260

265

270

Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala

275

280

285

Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu

290

295

300

Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu

305                      310                      315                      320

Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro

                         325                      330                      335

Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro Pro Met Ala Glu

                         340                      345                      350

Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro

                         355                      360                      365

Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

                         370                      375

<210> 15

<211> 1383

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

<400> 15

atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctc cag gga 48

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg 96

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc 144

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc 192

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50

55

60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc 240

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr

65

70

75

80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc 288

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

85

90

95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt 336

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe

100

105

110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg 384  
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val  
115 120 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac 432  
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp  
130 135 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac 480  
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr  
145 150 155 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc 528  
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile  
165 170 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa 576  
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys  
180 185 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc 624  
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser  
195 200 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag 672

Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln  
210 215 220

acc cag tca gag gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca 720  
Thr Gln Ser Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
225 230 235 240

ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc 768  
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
245 250 255

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc 816  
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
260 265 270

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc 864  
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
275 280 285

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg 912  
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
290 295 300

cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc 960  
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
305 310 315 320

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc 1008

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

325

330

335

tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc 1056

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

340

345

350

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg 1104

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

355

360

365

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc 1152

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

370

375

380

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg 1200

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

385

390

395

400

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc 1248

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

405

410

415

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag 1296

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

420

425

430

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac 1344

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

435

440

445

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga

1383

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

455

460

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 460

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45



Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50

55

60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr

65

70

75

80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

85

90

95

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe

100

105

110

Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val

115

120

125

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp

130

135

140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr

145

150

155

160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile

165

170

175

Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys

180	185	190
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser		
195	200	205
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln		
210	215	220
Thr Gln Ser Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
225	230	235 240
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
245	250	255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
260	265	270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
275	280	285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
290	295	300
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
305	310	315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

325

330

335

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

340

345

350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

355

360

365

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

370

375

380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

385

390

395

400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

405

410

415

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

420

425

430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

435

440

445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

455

460

<210> 17

<211> 477

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(474)

<400> 17

atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga 48

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg 96

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc 144

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc 192

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50	55	60	
tgc agc ctc cac agg tgc gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc			240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr			
65	70	75	80
tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc			288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val			
	85	90	95
aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt			336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe			
	100	105	110
ctc ctg gct gag agc aag tcc gag gag aaa gct gat ctc agt gga ctc			384
Leu Leu Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala Asp Leu Ser Gly Leu			
	115	120	125
aag aag tgt ctc cct cct ccc cct gga gtt ccg caa aga ctc gag cta			432
Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro Gln Arg Leu Glu Leu			
	130	135	140
agg gcg cgc cag gac tac aag gac gac gat gac aag acg cgt taa			477
Arg Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Arg			
145	150	155	

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 158

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50

55

60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr

65

70

75

80

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

85

90

95

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe

100

105

110

Leu Leu Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala Asp Leu Ser Gly Leu

115

120

125

Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro Gln Arg Leu Glu Leu

130

135

140

Arg Ala Arg Gln Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Thr Arg

145

150

155

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 144

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 19

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35

40

45

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser

50

55

60

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr

65

70

75

80

Ser His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val

85

90

95

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Phe Gln Glu Cys Gly Ser Phe

100

105

110

Leu Arg Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala Asp Leu Ser Gly Leu

115

120

125

Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro Gln Arg Leu Glu Leu

130

135

140

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 1960

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 20



cagccagcgg cctcagacag acccactggc gtctctctgc tgagtgaccg taagctcggc 60  
gtctggccct ctgcctgcct ctccctgagt gtggctgaca gccacgcagc tgtgtctgtc 120  
tgtctgcggc cegtgcaccc ctgctgcggc cgcttggtac cttccttgcc gtctctttcc 180  
tctgtctgct gctctgtggg acacctgcct ggaggcccag ctgcccgta tcagagtgc 240  
aggtcttatg acagcctgat tggtagctcg ggctgggtgt ggattctcac cccaggcctc 300  
tgctgcttt ctcagaccct catcggtcac ccccacgtg aaccagctg ccacccccag 360  
aagcccatca gactgcccc agcacacgga atggatttct gagaaagaag ccgaaacaga 420  
aggcccgtgg gagtcagc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc tcc ttg ctc ctg 471  
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Ser Leu Leu Leu  
1 5 10  
ctg ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc 519  
Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr  
15 20 25  
gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac 567  
Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His  
30 35 40

ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag 615

Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys

45

50

55

gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg 663

Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr

60

65

70

75

cat gcc acc tac acc agc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac 711

His Ala Thr Tyr Thr Ser His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp

80

85

90

gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac ttc cag 759

Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Phe Gln

95

100

105

gag tgt ggc agc ttt ctc cgg gct gag agc aag tcc gag gag aaa gct 807

Glu Cys Gly Ser Phe Leu Arg Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala

110

115

120

gat ctc agt gga ctc aag aag tgt ctc cct cct ccc cct gga gtt ccg 855

Asp Leu Ser Gly Leu Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro

125

130

135

caa aga ctc gag cta tgagctgcag gtgcgggcag ggcccatgcc tggtcctcc 910

Gln Arg Leu Glu Leu

140

taccagggga cctggagtga atggagtga ccggtcatct ttcagacca gtcagaggag 970

ttaaaggaag gctggaacce tcacctgctg cttctctcc tgcttgatcat agtcttcatt 1030

cctgccttct ggagcctgaa gaccatecca ttgtggaggc tatggaagaa gatatgggcc 1090

gtccccagcc ctgagcgggt cttcatgccc ctgtacaagg gctgcagcgg agacttcaag 1150

aaatgggtgg gtgcaccctt cactggtccc agcctggagc tgggacctg gagcccagag 1210

gtgccctcca ccctggagggt gtacagctgc caccaccac ggagcccggc caagaggctg 1270

cagctcacgg agctacaaga accagcagag ctggtggagt ctgacggtgt gcccaagccc 1330

agcttctggc cgacagccca gaactcgggg ggctcagctt acagtgagga gagggatcgg 1390

ccatacggcc tgggtgtccat tgacacagtg actgtgctag atgcagaggg gccatgcacc 1450

tggccctgca gctgtgagga tgacggctac ccagccctgg acctggatgc tggcctggag 1510

cccagcccag gcctagagga cccactcttg gatgcaggga ccacagtcct gtcctgtggc 1570

tgtgtctcag ctggcagccc tgggctagga gggccctgg gaagcctcct ggacagacta 1630

aagccacccc ttgcagatgg ggaggactgg gctgggggac tgcctgggg tggccgggtca 1690

cctggagggg tctcagagag tgaggcgggc tcaccctgg ccggcctgga tatggacacg 1750

tttgacagtg gctttgtgtg ctctgactgc agcagccctg tggagtgtga cttcaccage 1810

cccggggacg aaggaccccc ccggagctac ctccgccagt ggggtggcat tcctccgcca 1870

ctttcgagcc ctggacccca ggcagctaa tgaggctgac tggatgtcca gagctggcca 1930

ggccactggg ccctgagcca gaaaaaaaaa 1960

<210> 21

<211> 538

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Ser Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

20

25

30

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr

35	40	45
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser		
50	55	60
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr		
65	70	75 80
Ser His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val		
85	90	95
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Phe Gln Glu Cys Gly Ser Phe		
100	105	110
Leu Arg Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val		
115	120	125
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Arg Arg Ser Asp Tyr Glu Asp		
130	135	140
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr		
145	150	155 160
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile		
165	170	175

Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys

180

185

190

Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser

195

200

205

Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln

210

215

220

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu

225

230

235

240

Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys

245

250

255

Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser

260

265

270

Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe

275

280

285

Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly

290

295

300

Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His

305

310

315

320

Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu

325

330

335

Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp

340

345

350

Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp

355

360

365

Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala

370

375

380

Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro

385

390

395

400

Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp

405

410

415

Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser

420

425

430

Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg

435

440

445

Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro

450                      455                      460

Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser

465                      470                      475                      480

Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Cys

                    485                      490                      495

Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp

                    500                      505                      510

Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro

                    515                      520                      525

Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

                    530                      535

<210> 22

<211> 2115

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

cagccagcgg cctcagacag acccactggc gtctctctgc tgagtgaccg taagctcggc 60



gtctggccct ctgcctgcct ctccctgagt gtggctgaca gccacgcagc tgtgtctgtc 120

tgtctgcggc cegtgcaccc ctgctgcggc cgcctggtag ctcccttgcc gtctctttcc 180

tctgtctgct gctctgtggg acacctgcct ggaggcccag ctgcccgta tcagagtgc 240

aggtcttatg acagcctgat tggtagctcg ggctgggtgt ggattctcac cccaggcctc 300

tgcctgcttt ctacagacct catcggtcac cccacgctg aaccagctg ccacccccag 360

aagcccatca gactgcccc agcacacgga atggatttct gagaaagaag ccgaaacaga 420

aggcccgtag gagtcagc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc tcc ttg ctc ctg 471

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Ser Leu Leu Leu

1

5

10

ctg ctg ctc cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc 519

Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr

15

20

25

gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac 567

Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His

30

35

40

ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag 615

Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys

45	50	55	
gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg			663
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr			
60	65	70	75
cat gcc acc tac acc agc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac			711
His Ala Thr Tyr Thr Ser His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp			
	80	85	90
gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac ttc cag			759
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Phe Gln			
95	100	105	
gag tgt ggc agc ttt ctc cgg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct			807
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Arg Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro			
110	115	120	
ttc aac gtg act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc agg cgc			855
Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Arg Arg			
125	130	135	
tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag			903
Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln			
140	145	150	155

tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg 951

Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro

160

165

170

agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc 999

Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro

175

180

185

ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg 1047

Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly

190

195

200

ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac 1095

Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp

205

210

215

ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac 1143

Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn

220

225

230

235

cct cac ctg ctg ctt ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc 1191

Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala

240

245

250

ttc tgg agc ctg aag acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata 1239

Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile

255	260	265	
tgg gcc gtc ccc agc cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc			1287
Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly			
270	275	280	
tgc agc gga gac ttc aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc			1335
Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser			
285	290	295	
agc ctg gag ctg gga ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag			1383
Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu			
300	305	310	315
gtg tac agc tgc cac cca cca cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc			1431
Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu			
320	325	330	
acg gag cta caa gaa cca gca gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc			1479
Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro			
335	340	345	
aag ccc agc ttc tgg ccg aca gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac			1527
Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr			
350	355	360	

agt gag gag agg gat cgg cca tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg 1575

Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val

365

370

375

act gtg cta gat gca gag ggg cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag 1623

Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu

380

385

390

395

gat gac ggc tac cca gcc ctg gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc 1671

Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser

400

405

410

cca ggc cta gag gac cca ctc ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc 1719

Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser

415

420

425

tgt ggc tgt gtc tca gct ggc agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga 1767

Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly

430

435

440

agc ctc ctg gac aga cta aag cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg 1815

Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp

445

450

455

gct ggg gga ctg ccc tgg ggt ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag 1863

Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu

460	465	470	475	
agt gag gcg ggc tca ccc ctg gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp				1911
	480	485	490	
agt ggc ttt gtg tgc tct gac tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc Ser Gly Phe Val Cys Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe				1959
	495	500	505	
acc agc ccc ggg gac gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp				2007
	510	515	520	
gtg gtc att cct ccg cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser				2052
	525	530	535	
taatgaggct gactggatgt ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagaaaaaa				2112
aaa				2115

<210> 23

**<211> 411**

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1)..(411)

<400> 23

taatgaggct gactggatgt ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagagacaa 60

ggtcacctgg gctgtgatgt gaagacacct gcagcctttg gtctcctgga tgggcctttg 120

agcctgatgt ttacagtgtc tgtgtgtgtg tgcatatgtg tgtgtgtgca tatgcatgtg 180

tgtgtgtgtg tgtgtcttag gtgcgcagtg gcatgtccac gtgtgtgtga ttgcacgtgc 240

ctgtgggcct gggataatgc ccatggtact ccatgcattc acctgccctg tgcatgtctg 300

gactcacgga gctcacccat gtgcacaagt gtgcacagta aacgtgtttg tggtaaacag 360

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 411

<210> 24

<211> 877

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1)..(877)

<400> 24

taatgaggct gactggatgt ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagagacaa 60

ggtcacctgg gctgtgatgt gaagacacct gcagcctttg gtctcctgga tgggcctttg 120

agcctgatgt ttacagtgtc tgttgtgtgtg tgtgcatatg tgttgtgtgtg catatgcatg 180

tgttgtgtgtg tgttgtgtctt aggtgcgcag tggcatgtcc acgttgtgtgt gtgattgcac 240

gtgcctgtgg gcctgggata atgcccattg tactccatgc attcacctgc cctgtgcatg 300

tctggactca cggagctcac ccatgtgcac aagtgtgcac agtaaactgt tttgttgtca 360

acagatgaca acagccgtcc tccctcctag ggtcttgtgt tgcaagttgg tccacagcat 420

ctccggggct ttgtgggatc agggcattgc ctgtgactga ggcggagccc agccctccag 480

cgtctgcctc caggagctgc aagaagtcca tattgttctt taccacctgc caacaggaag 540

cgaaagggga tggagtgage ccatggtgac ctcgggaatg gcaatttttt gggcggcccc 600



tggacgaagg tctgaatccc gactctgata ccttctggct gtgctacctg agccaagtcg 660

cctccccctct ctgggctaga gtttccttat ccagacagtg gggaaggcat gacacacctg 720

ggggaaattg gcgatgtcac ccgtgtacgg tacgcagccc agagcagacc ctcaataaac 780

gtcagcttcc ttccttctgc ggccagagcc gaggcgggcg ggggtgagaa catcaatcgt 840

cagcgacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 877

<210> 25

<211> 2791

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1)..(2791)

<400> 25

taatgaggct gactggatgt ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagagacaa 60

ggtcacctgg gctgtgatgt gaagacacct gcagcctttg gtctcctgga tgggcctttg 120

agcctgatgt ttacagtgtc tgtgtgtgtg tgtgcatatg tgtgtgtgtg catatgcatg 180

tgtgtgtgtg tgtgtgtctt aggtgcgcag tggcatgtcc acgtgtgtgt gtgattgcac 240  
gtgcctgtgg gcctgggata atgcccattg tactccatgc attcacctgc cctgtgcatg 300  
tctggactca cggagctcac ccatgtgcac aagtgtgcac agtaaactgt tttgttgtca 360  
acagatgaca acagccgtcc tccctcctag ggtcttgtgt tgcaagttgg tccacagcat 420  
ctccggggct ttgtgggata agggcattgc ctgtgactga ggccggagccc agccctccag 480  
cgtctgcctc caggagctgc aagaagtcca tattgttctt taccacctgc caacaggaag 540  
cgaaagggga tggagtgagc ccatggtgac ctccgggaatg gcaatttttt gggcggcccc 600  
tggacgaagg tctgaatccc gactctgata ccttctggct gtgctacctg agccaagtcg 660  
ctccccctct ctgggctaga gtttccttat ccagacagtg gggaaggcat gacacacctg 720  
ggggaaattg gcgatgtcac ccgtgtacgg tacgcagccc agagcagacc ctcaataaac 780  
gtcagcttcc ttccttctgc ggccagagcc gaggcgggcg ggggtgagaa catcaatcgt 840  
cagcgacagc ctgggcaccc gcggggccgt cccgcctgca gagggccact cggggggggtt 900  
tccaggetta aaatcagtec gtttcgtctc ttggaacag ctccccacca accaagattt 960

ctttttctaa cttctgctac taagttttta aaaattecct ttatgcaccc aagagatatt 1020  
tattaaacac caattacgta gcaggccatg gctcatggga cccaccccc gtggcactca 1080  
tggagggggc tgcaggttgg aactatgcag tgtgctcgg ccacacatcc tgctgggccc 1140  
cctaccctgc cccaattcaa tcctgccaat aaatcctgtc ttatttggtc atcctggaga 1200  
attgaaggga ggtcaagttg tttgtcaatg atttgtcaga gaacctgttg aaatgtgaat 1260  
taagaagcta agaaaatatt tcttagcaac attttctttt tctttttttt ttttttcttt 1320  
tgagacagag tctcactctc gtcgccagg ctggaatgca gtggtgcgat ctcggctctc 1380  
tgcaacctct gtctcccggg ttcaagcgat ttctgcgtc agccccagag tagctggaat 1440  
tacaggcaca caccaccag cctggctaata tttgtattt ttagtagagc tggggccacc 1500  
ctggcccggc cccgtcttcc tccccaaagg tcagactgca ggctgcagg ctgtgctgga 1560  
ggagccagct ctagctcacc catgcttttg caacagggtc gggttggaag tcagcacagg 1620  
tcagtctgc ggaaggttcc ttctgactc atctgtgaag tggggtggtt gggagaggta 1680  
gctgagagaa tgcatgagag tcctcggtgc ctggcaggag gctggaaggt tctagaacac 1740

tgatggttat aagagtggga ctgtgagcct gggatcgggg ggtgtgagac ttgatggga 1800

gcacaagagt ggaaacacag cttctgcacg gagcaggcgc agccctcaac acccgtgca 1860

cctgcaccct agggactctt gggtcagat gtgctgtggt ttacacacct tcttgggggc 1920

aacaggttcc aggagccacc tgtgggtgcc acctgagcca caggctccca ggaaagcagc 1980

acagctctcc tgcaccaga gcttgctggg tggcggaggg gaacacagat ggttggggaa 2040

ggcctgaggc cagattgggg gactctggac tggggcagat gaggctctc agaatccac 2100

ctttgaaggg aactcagctt ataaacacag aggagcaaag ttggagggcc gggcgtagtg 2160

gtcacacacct gtgatctcag cactttggga ggccaaggaa ggtggatcac ttgaggccag 2220

gagttcgaga ccagcctggg caacatagca aggccccatc tctacaaaaa ttattatatt 2280

ttaaaaaaat tagccaggtg tgggtggtgct tgcctatagt ccagctact cgggaggcta 2340

aggtgggagg atcgctggag ccaggaatt tgaggctgca gtgagctgtg attacaccgt 2400

tgcactccag cctgggtcac agatcaagac cctgtctctt aaaaataaaa gttggagaca 2460

agagctggct cacctgaaag gagggattag taggtaggag ggtggatgga ggtggatgg 2520

atgtgtgggt ggataggaag atggtattaa gttggtgcaa aagtctttga tattactctt 2580

aatggcttta ataaaaagct tgaaggaaga atgattgggt ggatagacag agataaatgc 2640

atactggaaa caaagataaa gataaaacac aagttatacc aggccagcaa ctctattttg 2700

ttcactgcct ttagtcccag cctggcacat agtaggcact caataaagcc tgatttgtag 2760

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2791

<210> 26

<211> 907

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 3' UTR

<222> (1)..(907)

<400> 26

tgagctgcag gtgcgggcag ggcccatgcc tggtctctcc taccagggga cctggagtga 60

atggagtgcac ccggtcatct ttcagaccca gtcagaggag ttaaaggaag gctggaaccc 120

tcacctgctg cttctcctcc tgcttgtcat agtcttcatt cctgccttct ggagcctgaa 180  
gacctatcca ttgtggaggc tatggaagaa gatatgggcc gtccccagcc ctgagcggtt 240  
cttcatgccc ctgtacaagg gctgcagcgg agacttcaag aaatgggtgg gtgcaccctt 300  
cactggetcc agcctggagc tgggaccctg gagcccagag gtgccctcca ccctggaggt 360  
gtacagctgc caccaccca gcagccctgt ggagtgtgac ttcaccagcc ccggggacga 420  
aggaccccc cggagctacc tccgccagt ggtggtcatt cctccgccac tttcagccc 480  
tggaaccag gccagctaata gaggtgact ggatgtccag agctggccag gccactgggc 540  
cctgagccag agacaaggtc acctgggctg tgatgtgaag acacctgcag cttttggtct 600  
cctggatggg cttttgagcc tgatgtttac agtgtctgtg tgtgtgtgca tatgtgtgtg 660  
tgtgcatatg catgtgtgtg tgtgtgtgtg tcttaggtgc gcagtggcat gtccacgtgt 720  
gtgtgattgc acgtgcctgt gggcctggga taatgcccac ggtactccat gcattcacct 780  
gccctgtgca tgtctggact cacggagctc acctatgtgc acaagtgtgc acagtaaacg 840  
tgtttgtggt caacagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900

aaaaaaa

907

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 3818

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (1)..(3818)

&lt;400&gt; 27

tgagctgcag gtgcgggcag ggcccatgcc tggctcctcc taccagggga cctggagtga 60

atggagtgac ccggtcatct ttcagacca gtcagaggag ttaaaggaag gctggaaccc 120

tcacctgctg cttctcctcc tgcttgteat agtcttcatt cctgccttct ggagcctgaa 180

gacctatcca ttgtggaggc tatggaagaa gatatgggcc gtccccagcc ctgagcgggt 240

cttcatgccc ctgtacaagg gctgcagcgg agacttcaag aaatgggtgg gtgcaccctt 300

cactggetcc agcctggagc tgggacctg gagcccagag gtgccctcca ccctggaggt 360

gtacagctgc caccaccac ggagcccggc caagaggctg cagctcacgg agctacaaga 420

accagcagag ctggtggagt ctgacggtgt gcccaagccc agcttctggc cgacagccca 480  
gaactcgggg ggctcagctt acagtgagga gagggatcgg ccatacggcc tgggtgtccat 540  
tgacacagtg actgtgctag atgcagaggg gccatgcacc tggccctgca gctgtgagga 600  
tgacggctac ccagccctgg acctggatgc tggcctggag cccagcccag gcctagagga 660  
cccactcttg gatgcaggga ccacagtcct gtccctgtggc tgtgtctcag ctggcagccc 720  
tgggctagga gggcccctgg gaagcctcct ggacagacta aagccacccc ttgcagatgg 780  
ggaggactgg gctgggggac tgccctgggg tggccggtca cctggagggg tctcagagag 840  
tgaggcgggc tcacccttg cggcctgga tatggacag tttgacagt gctttgtggg 900  
ctctgactgc agcagccctg tggagtgtga cttcaccage cccggggacg aaggaccccc 960  
ccggagctac ctcgccagt gggtagtcat tctccgcca ctttcagacc ctggacccca 1020  
ggccagctaa tgaggctgac tggatgtcca gagctggcca ggccactggg ccctgagcca 1080  
gagacaaggt cacctgggct gtgatgtgaa gacacctgca gcctttggtc tcctggatgg 1140  
gcctttgagc ctgatgttta cagtgtctgt gtgtgtgtgt gcatatgtgt gtgtgtgcat 1200



atgcatgtgt gtgtgtgtgt gtgtcttagg tgcgcagtgg catgtccacg tgtgtgtgtg 1260

attgcacgtg cctgtgggcc tgggataatg cccatggtac tccatgcatt cacctgcctt 1320

gtgcatgtct ggactcacgg agtcaccca tgtgcacaag tgtgcacagt aaacgtgttt 1380

gtggtcaaca gatgacaaca gccgtcctcc ctccatagggt cttgtgttgc aagtttgtcc 1440

acagcatctc cggggctttg tgggatcagg gcattgcctg tgactgaggc ggagcccagc 1500

cctccagcgt ctgcctccag gagctgcaag aagtcatat gtctccttat cacctgccc 1560

caggaagcga aaggggatgg agtgagccca tggtagacct gggaatggca attttttggg 1620

cggccccctg acgaaggtct gaatcccgac tctgatacct tctggctgtg ctacctgagc 1680

caagtcgcct cccctctctg ggctagagtt tccttateca gacagtgggg aaggcatgac 1740

acacctgggg gaaattggcg atgtacccg tgtacggtac gcagcccaga gcagaccctc 1800

aataaacgtc agcttccttc cttctgcggc cagagccgag gcgggcgggg gtgagaacat 1860

caatcgtcag cgacagcctg ggcacccgcg gggccgtccc gcctgcagag ggccactcgg 1920

gggggtttcc aggcttaaaa tcagtcggtt tcgtctcttg gaaacagctc cccaccaacc 1980

aagatttctt tttctaactt ctgctactaa gtttttaaaa attcccttta tgcaccaag 2040

agatatttat taaacaccaa ttacgtagca ggccatggct catgggaccc accccccgtg 2100

gcactcatgg agggggctgc aggttgaac tatgcagtgt gtcggcca cacatcctgc 2160

tgggccccct accctgcccc aattcaatcc tgccaataaa tctgtctta tttgttcac 2220

ctggagaatt gaaggaggt caagttgtt gtcaatgatt tgcagagaa cctgttgaaa 2280

tgtgaattaa gaagctaaga aaatatttct tagcaacatt ttcttttct ttttttttt 2340

tttcttttga gacagagtct cactctctgc gccaggctg gaatgcagtg gtgcgatctc 2400

ggctctctgc aacctctgc tcccgggttc aagcgatttc ctgcgtcagc cccagagtag 2460

ctggaattac aggcacacac caccacgct ggctaatttt tgtattttta gtagagctgg 2520

ggccaccctg gcccgcccc gtcttctcc ccaaaggtca gactgcagc tgcagggtg 2580

tgctggagga gccagctcta gctcacccat gcttttgcaa cagggtcggg ttggaagtca 2640

gcacaggtca gtcctgcgga aggttccttc gtgactcatc tgtgaagtgg ggtggttggg 2700

agaggtagct gagagaatgc atgagagtcc tcggtgcctg gcaggaggct ggaaggttct 2760

agaacactga tggttataag agtgggactg tgagcctggg atcggggggt gtgagacttg 2820

gatgggagca caagagtgga aacacagctt ctgcacggag caggcgcagc cctcaacacc 2880

ccgtgcacct gcaccctagg gactcttggg tccagatgtg ctgtggtttt cacaccttct 2940

tgggggcaac aggttccagg agccacctgt ggggtgccacc tgagccacag gctcccagga 3000

aagcagcaca gctctcctgc acccagagct tgctgggtgg cggaggggaa cacagatggt 3060

tggggaaggc ctgaggccag attgggggac tctggactgg ggcagatgag gctcctcaga 3120

atcccacctt tgaagggaac tcagcttata aacacagagg agcaaagttg gagggccggg 3180

cgtagtggct cacacctgtg atctcagcac tttgggaggc caaggaaggt ggatcacttg 3240

aggccaggag ttcgagacca gcctgggcaa catagcaagg ccccatctct aaaaaaatta 3300

ttatTTTTTTT aaaaaattag ccaggtgtgg tgggtgcttg ctatagtcct agctactcgg 3360

gaggctaagg tgggaggatc gctggagccc aggaatttga ggctgcagtg agctgtgatt 3420

acaccgttgc actccagcct gggtcacaga tcaagaccct gtctcttaaa aataaaagtt 3480

ggagacaaga gctggctcac ctgaaaggag ggattagtag gtaggagggt ggatggagga 3540

tggatggatg tgtgggtgga taggaagatg gtattaagtt ggtgcaaaag tctttgatat 3600

tactcttaat ggctttaata aaaagcttga aggaagaatg attggttgga tagacagaga 3660

taaatgcata ctggaaacaa agataaagat aaaacacaag ttataccagg ccagcaactc 3720

tattttgttc actgccttta gtcccagcct ggcacatagt aggcactcaa taaagcctga 3780

ttttagcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3818

<210> 28

<211> 330

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> primer sequence(1-30,301-330)

mouse cDNA sequence(31-300)

<400> 28

ccggctcccc ctttcaacgt gactgtgacc ttctcaggac agtataatat ctccaggcgc 60

tcagattacg aagaccctgc cttctacatg ctgaagggca agcttcagta tgagctgcag 120

tacaggaacc ggggagaccc ctgggctgtg agtccgagga gaaagctgat ctcagtggac 180

tcaagaagtg tctccctcct cccctggag ttccgcaaag actcgagcta tgagctgcag 240

gtgcgggcag ggcccatgcc tggctcctcc taccagggga cctggagtga atggagtgc 300

ccggtcatct ttcagacca gtcagagggt 330

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 29

tccaggcgct cagattacga agaccctgcc 30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 30

ACTCCAGGTC CCCTGGTAGG AGGAGCCAGG

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03351

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/715, C07K19/00, C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02,  
G01N33/50, C07K16/16/28, G01N33/53, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K14/715, C07K19/00, C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02,  
G01N33/50, C07K16/16/28, G01N33/53, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem. 271[23] (1996) Robb L. et al., "Structural Analysis of the Gene Encoding the Murine Interleukin-11 Receptor $\alpha$ -Chain and a Related Locus" p.13754-13761	1-21
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) Gainsford T. et al., "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemapoietic cells" p.14564-14568	1-21
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) Hilton D.J. et al., "Cloning and Characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor" p.497-501	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later than  
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority  
date and not in conflict with the application but cited to understand  
the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step  
when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such combination  
being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 September, 1999 (24. 09. 99)

Date of mailing of the international search report  
5 October, 1999 (05. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C07K14/715, C07K19/00, C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/50, C07K16/16/28, G01N33/53, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C07K14/715, C07K19/00, C12N15/12, C12N5/10, C12P21/02, G01N33/50, C07K16/16/28, G01N33/53, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem. 271[23] (1996) Robb L. et al. "Structural Analysis of the Gene Encoding the Murine Interleukin-11 Receptor $\alpha$ -Chain and a Related Locus" p. 13754-13761	1-21
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) Gainsford T. et al. "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells" p. 14564-14568	1-21
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) Hilton D. J. et al. "Cloning and Characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor" p. 497-501	1-21
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	24. 09. 99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448